

UNTERSUCHUNG AN BESTRAHLTER
LACTATDEHYDROGENASE MIT HILFE
DER GELELEKTROPHORESE

von

Otmar Huth

aus

Nürnberg



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Radiologie
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. phil. nat. H. Pauly

UNTERSUCHUNG AN BESTRAHLTER LACTATDEHYDROGENASE MIT HILFE DER GELELEKTROPHORESE

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Otmar Huth
aus
Nürnberg

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. W. Kersten
Referent: Priv.-Doz. Dr. H. Schüßler
Korreferent: Prof. Dr. Dr. H. Pauly
Tag der mündlichen Prüfung: 23.03.1981

INHALTSÜBERSICHT

Seite

1	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
2	EXPERIMENTELLER TEIL	6
2.1	Materialien und Geräte	6
2.1.1	Materialien	6
2.1.2	Geräte	7
2.2	Methoden	8
2.2.1	Vorbereitung des Enzyms für die Bestrahlung	8
2.2.1.1	Allgemeines	8
2.2.1.2	Entsalzen und Einstellen des Proteingehalts	8
2.2.1.2.1	Pufferherstellung	8
2.2.1.2.2	Chromatographische Entsalzung	9
2.2.1.2.3	Messung des Proteingehalts	9
2.2.1.2.4	Einstellen des Proteingehalts	10
2.2.2	Bestrahlung	11
2.2.2.1	Bestrahlungsbedingungen	11
2.2.2.2	Dosisleistung und Dosis	14
2.2.3	SDS Polyacrylamidgel Elektrophorese	16
2.2.3.1	Allgemein	16
2.2.3.2	Gelherstellung	16
2.2.3.3	Vorbereitung der Proteinprobe	17
2.2.3.4	Elektrophorese	18
2.2.3.4.1	Aufbau	18
2.2.3.4.2	Durchführung	20

		Seite
2.2.3.5	Färben der Gele	21
2.2.3.6	Entfärben der Gele	22
2.2.3.7	Eichung nach dem Molekulargewicht	23
2.2.3.8	Reproduzierbarkeit	23
2.2.4	Auswertung der gefärbten Gele	24
2.2.4.1	Photometrische Densitometrie	24
2.2.4.2	Molekulargewichtsbestimmung	26
2.2.4.3	Beurteilung des Färbeverhaltens	26
2.2.4.4	Umrechnung der planimetrierten Flächen	26
2.2.5	Qualitative Auswertung	27
2.2.6	Quantitative Auswertung	27
3	VERSUCHSDURCHFÜHRUNG UND ERGEBNISSE	28
3.1	Grundlagen der SDS - PAGE	28
3.2	Allgemeines zur Gewinnung der Untersuchungsergebnisse an den bestrahlten Proben	32
3.3	Radiolyse unter Stickstoff	35
3.4	Radiolyse unter Distickstoffoxid	46
3.5	Vergleich der Ergebnisse bei Bestrahlung unter Stickstoff und Distickstoffoxid	47
3.6	Vergleich der Ergebnisse mit den Dosis - Effekt - Kurven vorhergehender Arbeiten	53
4	DISKUSSION	58
5	ZUSAMMENFASSUNG	72
6	LITERATURVERZEICHNIS	74

Proteine erfüllen in lebenden Zellen diverse Aufgaben, zwei davon sind die Katalyse bestimmter Stoffwechselprozesse und die Schutzfunktion für lebenswichtige Strukturen wie die der DNS. Bei der Bestrahlung mit Röntgenstrahlen werden diese beiden Aufgaben berührt. Einerseits wird die enzymatische Aktivität durch Veränderung der Struktur gemindert, andererseits wird die Schutzfunktion dadurch bestätigt, daß Proteine mit den bei der Bestrahlung entstehenden Radikalen schneller reagieren als zum Beispiel DNS, da sie einen weit größeren Gewichtsanteil ausmachen, und somit eine Schädigung der genetischen Information der Zelle und damit des Lebewesens im Bereich niedriger Strahlendosen auf ein Minimum reduziert wird. Die Untersuchungen der Strahlenwirkung beschränken sich noch auf wenige gut bekannte Proteine.

Wir verwenden für unsere strahlenchemischen Experimente Lactatdehydrogenase, von der neben dem Molekulargewicht inzwischen auch die Struktur, die Zahl und Sequenz der Aminosäuren und die Zusammensetzung des aktiven Zentrums bekannt sind.

In der physiologischen Chemie wird LDH hauptsächlich deshalb verwendet, weil sie eine Reaktion katalysiert, die auch bei hohen Temperaturen ohne Enzym nicht vonstatten geht.

LDH besteht aus 4 Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von je 36 000. Sie ist gegen chemische Einflüsse relativ stabil und an ihr läßt sich in fast idealer Weise der Zusammenhang zwischen Funktion und Struktur beobachten.

Nach Aufklärung der Tertiärstruktur durch Röntgenstrukturanalyse (1,2) und der vollständigen Sequenz der monomeren Untereinheiten (3), sowie der Struktur des aktiven Zentrums und der Substrat und Coenzym bindenden Aminosäuren (4), können die bei Bestrahlung und Aminosäurenanalyse erhaltenen Ergebnisse hinsichtlich dem Zusammenhang zwischen Funktionseinbuße und Veränderung der Molekülstruktur gezielter beurteilt werden.

Als Beispiel dafür sei die Beurteilung der SH- Gruppen Veränderungen genannt.

Von Fondy (5) und Holbrook (6) wurde gezeigt, daß die Aminosäuresequenz von LDH bei verschiedenen Spezies in weiten Teilen identisch ist und daß sich ein für die enzymatische Funktion essentielles Cystein bei fast allen aufgeklärten LDH Molekülen an identischer Stelle befindet. Ebenfalls identisch ist die AS-Sequenz der diese Cystein umgebenden Aminosäuren (7).

Dieses Cystein, nach Strukturanalyse mit der Nummer 165 versehen, wird von vielen Autoren für den grundlegenden Angriffspunkt bei der Inaktivierung von LDH durch freie Radikale gehalten (8,9,10,11), da bei dessen Zerstörung eine Positionsänderung von Arginin 171 auftreten soll. Dieses Arginin 171 ist aber wiederum an der Bindung des Pyruvats beteiligt (12), weshalb eine Veränderung der räumlichen Stellung dieser Aminosäure eine Inaktivierung der LDH bewirken soll.

Die Reaktion der SH-Gruppe des Cysteins 165 wurde zwar schon früher beschrieben (14,15,16) und der Reaktion mit solvatisierten Elektronen zugeordnet. Es wurde dabei aber nur eine Anlagerungsreaktion des Elektrons gedeutet

und eine Inaktivierung des Moleküls wurde daraus nicht abgeleitet, sondern verneint.

Wie aus dem Beispiel zu ersehen ist, lassen sich bei genauerer Kenntnis der Details zwar differenzierte Aussagen machen, aber es wäre wegen der komplexen Vorgänge bei der Inaktivierung eines so großen Moleküls zum jetzigen Zeitpunkt wohl voreilig auf Grund von Einzelreaktionen Aussagen über deren Wirkung auf die Gesamtstruktur oder die Aktivität des Moleküls machen zu wollen.

Bei den von uns verwendeten Bestrahlungsbedingungen kommt es zu keiner direkten Strahlenwirkung, da wir Konzentrationen in der Größenordnung von 10^{-5} Mol LDH pro Liter verwendeten, während eine direkte Strahlenwirkung erst ab Konzentrationen von 1 Mol / l erwartet werden kann (16).

So konnten wir die Wirkung der Radiolyseprodukte des Wassers, die als solvatisierte Elektronen, sowie als OH - Radikale und als H - Radikale bezeichnet werden (17,18,19,20), an der LDH beobachten.

In verschiedenen Arbeiten (21,22,23,24) wurde über die Wirkung dieser Radikale schon geschrieben, so über ihre Wirkung bei Aminosäurenveränderung durch Bestrahlung, beim Abbau einzelner Aminosäuren oder bestimmter reaktiver Gruppen, in der Hauptsache aber bei der strahleninduzierten Inaktivierung.

Diese Arbeit soll, abweichend davon und in Ergänzung dazu, zu zeigen versuchen, wie sich die Primäreinheit der LDH unter Einwirkung der Radikale verhält.

Es gilt also zu untersuchen, ob sich bei der Radiolyse inter- oder intramolekulare Bindungen kovalenter Art bilden, ob zwischen den SH - Gruppen, von denen das

Enzym 16 besitzt, S - S Bindungen ausgebildet werden oder ob Kettenbrüche im Molekül auftreten.

Dazu wird das native Enzym in wäßriger Lösung mit Röntgenstrahlen bestrahlt und anschließend unter Zusatz von SDS bei 100°C in seine Untereinheiten zerlegt und denaturiert. Danach sollen mit Hilfe der Gelelektrophorese die Produkte nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und durch Messung des Molekulargewichts und der Menge der einzelnen entstehenden Produkte zu zeigen versucht werden, welche Reaktionen bei den verschiedenen Bestrahlungsbedingungen ablaufen und inwieweit sie von der Art der einwirkenden Radikale und von der Konzentration der bestrahlten LDH - Lösung abhängig sind.

Die Wechselwirkung von SDS mit Proteinen wurde in den letzten Jahren häufig beschrieben (25,26,27,28,29). Auf Grund dieser Untersuchungen wird angenommen, daß sich die hydrophoben aliphatischen Ketten an das Protein anlagern und die hydrophilen Sulfatgruppen durch gegenseitige Abstoßung die Entfaltung des Moleküls bedingen. Pro LDH Molekül werden 175 SDS Moleküle gebunden, sofern die Konzentration von SDS über $8 \cdot 10^{-4}$ M beträgt. Das entspricht einem Verhältnis von 1,4g SDS / g LDH (30,31). Bei vollständiger Beladung mit SDS können die Proteine, die nun keine störende Eigenladung mehr besitzen (32) und deren Länge sich nach vollständiger Entfaltung des Moleküls proportional zum Molekulargewicht verhält (33,34), durch die SDS Elektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden.

Unter Hinzuziehung von Eichproteinen können bei der Bestrahlung entstehende Aggregate oder Bruchstücke dem entsprechenden Molekulargewicht zugeordnet werden.

Durch Färbung der Proteine nach der Elektrophorese und Messung der durch Photometrie erhaltenen Flächen können diese auch quantitativ bestimmt werden, was im Folgenden zur Beurteilung der strahleninduzierten Änderung des LDH Moleküls unternommen werden soll. Diese Ergebnisse werden dann mit der Änderung der Aktivität und anderer untersuchter Parameter bei Bestrahlung in Beziehung gesetzt.

2 EXPERIMENTELLER TEIL

2.1 Materialien und Geräte

2.1.1 Materialien

Folgende Materialien und Chemikalien wurden verwendet:

- Lactatdehydrogenase ¹ aus Kaninchenmuskel in
3,2 M Ammoniumsulfat - Kristallsuspension
- Sephadex G 25 fine
- Dodecylsulfat ² Natriumsalz
- Mercaptoäthanol
- Acrylamid
- Methylenbisacrylamid ³
- Ammoniumpersulfat
- Tetramethyläthyldiamin ⁴
- Coomassie Brilliant Blue R 250 ⁵
- Methanol
- Essigsäure
- Combithek Eichproteine
- Stickstoff
- Distickstoffoxid
- RBS

Es wurde nur entionisiertes, zweimal quarzdestilliertes Wasser verwendet.

Abkürzungen:

- | | |
|---|-------|
| 1 | LDH |
| 2 | SDS |
| 3 | MBA |
| 4 | TEMED |
| 5 | CBB |

2.1.2

Geräte

- Therapie Röntgenröhre TR 300 f; Siemens Erlangen
- Kälte Thermostat Ultra Kryomat TK 30; Wobsa Lauda
- Spektralphotometer PMU; Zeiss Carl, Oberkochen
- Quarz Infrasil und Suprasil Küvetten
- Chromatographieröhre aus Plexiglas
- Bestrahlungstopf aus Plexiglas
- Anfertigung im Institut
- Ultro Rac Fraktionensammler LKB 7000
LKB Produkter, Bromma Schweden
- Shandon Disc Elektrophoresis Apparatus
Shandon Labortechnik, Frankfurt/Main
- Trockenschrank FTB 420; Heraeus, Hanau
- Wasserbad mit Schüttel Einrichtung; Ges. für Lab.tech.
- Beckman Spectrophotometer Model 24; Beckman USA
- Beckman Recorder; Beckman USA
- Dispensette ; Brand
- Analysenwaage; Mettler, Zürich
- Planimeter
- Calculator 9100 Hewlett Packard, Colorado/USA
- Mikropipetten; Marburg und Eppendorf Gerätebau, Hamburg
- Magnetprüfgerät JKA Combimag; Janke und Kunkel, Staufen
- Oxygen Analyzer Model 0260; Beckman Instruments/USA

2.2 Methoden

2.2.1 Vorbereitung des Enzyms für die Bestrahlung

2.2.1.1 Allgemeines

Die säulenchromatographische Trennung erfolgte unter möglichst sterilen Bedingungen. Die Auftragung der LDH erfolgte mit sterilen Pipetten, die Elution mit autoklaviertem Puffer. Die Säule selbst wurde vor und zwischen den Chromatographieläufen mit 2% Natriumazid-Lösung gespült. Vor dem Packen der Säule wurde mit 10% Alkohol desinfiziert, ebenso mit Marimon, danach mit sterilem destilliertem Wasser zweimal gespült. Desgleichen wurde das einzufüllende Sephadex G 25 autoklaviert.

Die Säule wurde im Kühlraum aufbewahrt und von Zeit zu Zeit mittels Inkubation eines Eluattropfens auf Agaragar auf Bakterienwachstum überprüft. Sämtliche Elutionsmittel wurden vor dem Auftragen mit der Wasserstrahlpumpe entgast.

2.2.1.2 Entsalzen und Einstellen des Proteingehalts

2.2.1.2.1 Pufferherstellung

Für die Entsalzung wurde der gleiche Puffer verwendet, unter dem die anschließende Bestrahlung stattfinden sollte. Es handelt sich dabei um 0,1 M Natrium Phosphat Puffer pH 7,0.

Das Enzympräparat wurde als Kristallsuspension in 3,2 M Ammoniumsulfat geliefert. Der hohe Salzgehalt, der bei der Bestrahlung störend wirken würde, wurde durch die chromatographische Trennung entfernt.

2.2.1.2.2 Chromatographische Entsalzung

Die Trennung wurde über Dextrangel Sephadex G 25 fine durchgeführt (Größe des Gelbettes: 14mm x 750mm).

Zur besseren Lösung des Enzyms wurden 6ml der gelieferten Enzymsuspension zuerst in der gleichen Menge des Elutionspuffers gelöst.

Dann erfolgte der Auftrag auf die Säule und die Elution mit einer Tropfengeschwindigkeit von 15 Tropfen pro Minute. Diese wurden in Fraktionen zu je 3ml gesammelt, was 45 Tropfen entspricht.

Es ergab sich eine rasche und gute Trennung des Enzyms vom Salz, da nach 20 Fraktionen praktisch das gesamte Enzym eluiert war und das Salz mit einer scharfen Abtrennung folgte. Als Nachweis der Trennung des Enzyms vom Ammoniumsulfat diente dessen Reaktion mit Nessler's Reagenz. (Siehe Abb.1)

Anfängliche Versuche mit längeren Säulen zeigten einen breiteren Elutionspeak und erreichten nicht die erforderliche Konzentration von 3mg/ml in mindestens 10ml des eluierten Volumens.

2.2.1.2.3 Messung des Proteingehalts

Der Enzymgehalt der einzelnen Fraktionen wurde durch Messung der UV Absorption bei 280nm in 1cm Quarzküvetten bei einer Spaltbreite von 0,1mm bestimmt.

Der Enzymgehalt wurde mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten ($= 1,44 \text{ ml/mg} \cdot \text{cm}$) berechnet, der für 0,1% Lösung von LDH₅ bei 280nm zugrundegelegt wurde. Es wurde gegen 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0 gemessen.

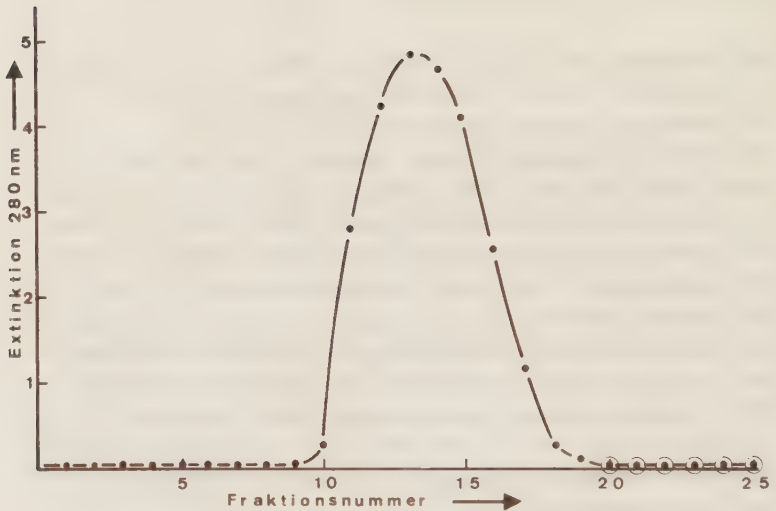


Abb. 1 Elutionsdiagramm 0 = Nachweis von Ammonium

2.2.1.2.4 Einstellen des Proteingehalts

Die Fraktionen mit den höchsten Extinktionen wurden gemischt und der Enzymgehalt erneut bestimmt. Bei Extinktionen über 3,0, die das Photometer nicht mehr anzeigt, wurde die Extinktion mittels Verdünnung einer kleinen Probe ermittelt. Durch Zugabe von salzfreien Fraktionen niedrigerer Extinktion wurden die gewünschten Konzentrationen erreicht.

2.2.2 Bestrahlung

2.2.2.1 Bestrahlungsbedingungen

Es wurden jeweils 10 ml LDH Lösung mit Enzymkonzentrationen zwischen 0,5 und 3,0 mg/ml bestrahlt. Die Proteinlösung befand sich dabei in einem Quarzgefäß, das von einem Kühlmantel umgeben war. Die 10ml Lösung ergaben eine Schichtdicke von 1,0 cm. Das Bestrahlungsgefäß hatte Öffnungen für Gaszuleitung und Probenentnahme. Genaue Beschreibung bei Abb. 2.

Die Lösung wurde auf etwa 4°C gekühlt und während der gesamten Bestrahlungszeit mit einem teflonbeschichteten Magnetrührer durchmischt.

Da die Bestrahlung unter verschiedenen Gasbedingungen durchgeführt werden sollte, wurde einmal Stickstoff, der mit Wasser gesättigt wurde, über die Lösung geleitet, zum anderen Distickstoffoxid, das mit Pyrogallol gereinigt wurde.

Diese Begasung wurde unter Stickstoff 2 Stunden vor der Bestrahlung durchgeführt. Der Restgehalt an Luft-sauerstoff betrug dann noch 2,5%. Bei Begasung mit Distickstoffoxid reichten 90 Minuten aus, um den Sauerstoff bis auf 1% aus der Lösung zu verdrängen. Abb. 3 zeigt die Messung des Sauerstoffgehalts in der Bestrahlungslösung.

Die konzentration von Distickstoffoxid betrug bei der Bestrahlung 0,05 Mol/l, wobei fast alle solvatisierten Elektronen mit dem Gas reagierten.

Während der Bestrahlung wurden alle 10 Minuten 0,1 ml der bestrahlten Lösung entnommen. Die Bestrahlungszeit betrug in den meisten Fällen 60 Minuten. Einzelne Proben wurden aber auch bis zu 180 Minuten bestrahlt.

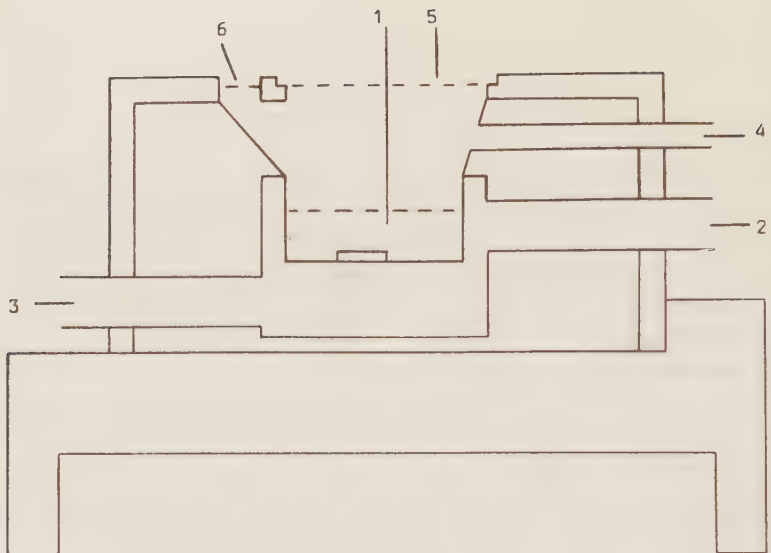


Abb.2 Darstellung des Bestrahlungsgefäßes im Schnitt

- 1, Quarzgefäß mit Probe und Magnetrührer
- 2, Kühlwasserabfluß
- 3, Kühlwasserzufluß
- 4, Gaszuleitung
- 5, Hostaphanfolie als Abdeckung des Gefäßes zur Röntgenröhre
- 6, Öffnung zur Probenentnahme, die bei der Bestrahlung mit Parafilm verschlossen wurde

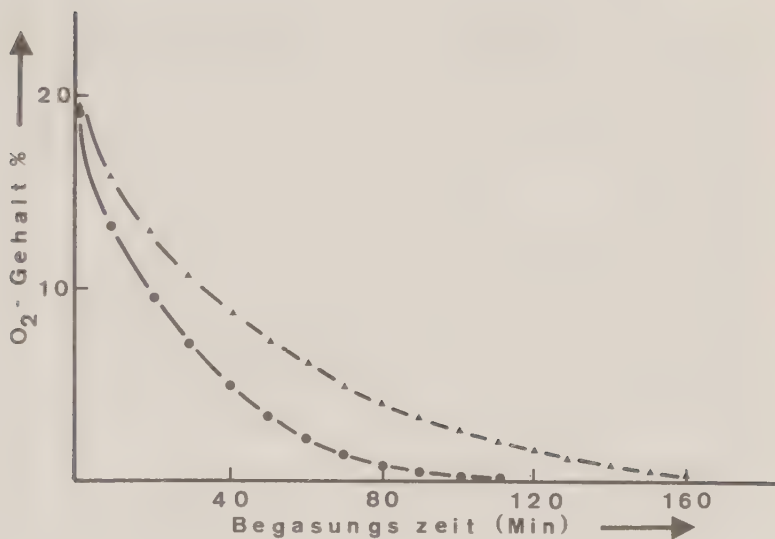


Abb. 3 Abnahme des Sauerstoffgehalts in Prozent
in Abhängigkeit von der Begasungszeit
und dem über die Lösung geleiteten Gas.
Dabei bedeutet
▲ die Überleitung von Stickstoff
● die Überleitung von Distickstoffoxid
Die Messungen wurden in dankenswerter Weise von
Frau Friedrich durchgeführt.

2.2.2.2 Dosisleistung und Dosis

Es wurde mit einer Röntgenröhre Stabilipan 300 der Firma Siemens bestrahlt. Die Röhrenspannung betrug 200 kV, der Röhrenstrom 20 mA bei 2mm Aluminiumfilterung.

Die Dosisleistung wurde nach dem Verfahren, das von Fricke (35) und Frankenberg (36) beschrieben wird, bestimmt.

Die Herstellung der zwei zur Fricke - Dosimetrie erforderlichen Lösungen und die Durchführung der Messungen ist ausführlich bei Zahn (24) beschrieben. Von Lösung 1, die NH_4FeSO_4 in schwefelsaurer Lösung enthielt, wurden in dem auch zur Bestrahlung des Proteins verwendeten Gefäß je 10 ml für 20, 40, 60 bis zu 180 Sekunden bestrahlt und danach die Extinktion bei 304 nm gemessen.

Je 3 ml einer Probe wurden mit 1 ml der Lösung 2, die NH_4SCN enthielt, gemischt und die Extinktion bei 426 nm gemessen. Aus der Steigung der sich dabei ergebenden Kurven wurde die Dosisleistung errechnet. Siehe Abb. 4.

Der Mittelwert betrug bei unseren Messungen 285 Gy / Min. Damit führte eine Bestrahlungszeit von 60 Minuten zu einer Dosis von 1710 Gray.

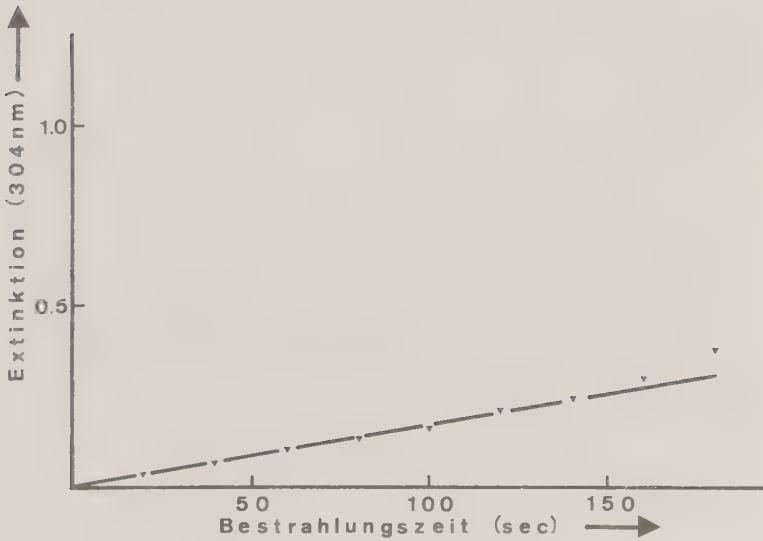
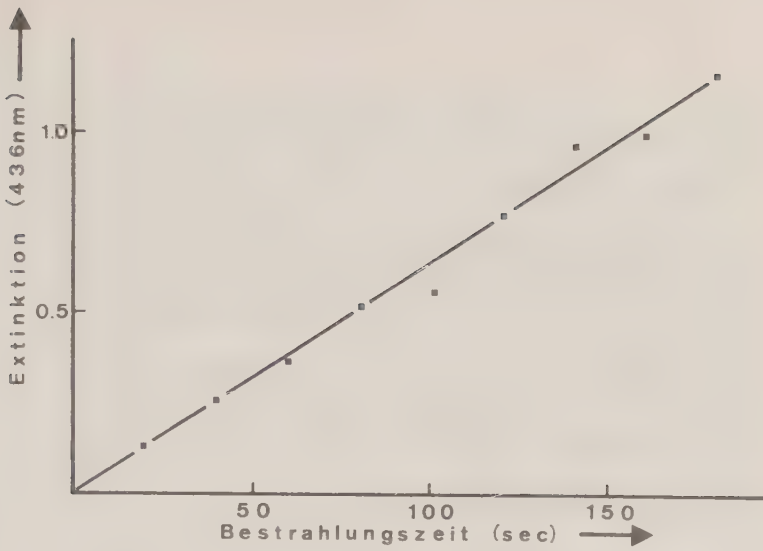


Abb. 4 Extinktionen der Lösungen zur Fricke - Dosimetrie

2.2.3 SDS Polyacrylamidgelelektrophorese¹

2.2.3.1 Allgemein

Die SDS-PAG Elektrophorese trennt Proteine nach ihrem Molekulargewicht auf. Der Einfluß der Eigenladung wird durch die Anlagerung der Sulfatgruppen ausgeschlossen.

Weitere Einzelheiten über die Wechselwirkung zwischen SDS und Proteinen und über die elektrophoretische Auftrennung unter 3.1.

2.2.3.2 Gelherstellung

Die Gelherstellung erfolgte nach der Vorschrift von Weber und Osborn (37) in der Weise, daß die Endkonzentration von Acrylamid im Gel 10% betrug. Dazu wurden folgende Stammlösungen hergestellt :

Acrylamid A :

22,2 g Acrylamid, 0,6 g MBA, Aqua dest. auf 100 ml

Gel Puffer :

2,0 g SDS, 7,8 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 38,6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,
Aqua dest. auf 1000 ml

Ammoniumpersulfatlösung : 15 mg $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ / ml in Aqua dest.

Zur Gelherstellung wurden nun 13,5 ml Acrylamid A mit 15 ml Gel Puffer und 1,5 ml Ammoniumpersulfatlösung gemischt und solange entgast, bis keine Blasenbildung mehr festzustellen war.

Zu der entgasten Lösung wurden 45 µl TEMED gegeben.

Darauf mußte die Lösung sofort in die vorbereiteten Glasröhrchen gefüllt werden, da die Gelbildung innerhalb von wenigen Minuten begann.

Die Glasröhrchen dienten zur Aufnahme des Gels während der Polymerisation und der Elektrophorese. Sie hatten eine Länge von 75 mm und einen Innendurchmesser von 5 mm.

Die Vorbereitung der Röhrchen erfolgte dermaßen, daß nach gründlicher Reinigung der Röhrchen die untere Öffnung mit Parafilm verschlossen wurde.

Etwa 20 Röhrchen wurden genau senkrecht stehend in einem dafür vorgesehenen Halter untergebracht, um bei der Polymerisation eine schräge, die Elektrophorese beeinträchtigende Oberfläche zu vermeiden.

1 cm unter der oberen Röhrchenöffnung wurde eine Markierung angebracht, um eine gleichmäßige Füllung zu gewährleisten. Beim Einfüllen entstandene Luftblasen mußten sofort entfernt werden.

Nach dem Einfüllen des Gels wurde oben noch ein Tropfen Aqua dest. aufgetragen, um eine Meniskusbildung des Gels zu verhindern. Nach Ablauf der Polymerisation, die etwa eine halbe Stunde in Anspruch nahm, wurde der untere Röhrchenverschluß abgenommen und die Glasröhrchen in ein Becherglas gestellt, das mit Aqua dest. gefüllt war, wo sie bis zur Elektrophorese aufbewahrt wurden.

Um gleiche Bedingungen zu erhalten, wurden die Gele nie länger als 3 Tage bis zur Elektrophorese aufbewahrt.

2.2.3.3 Vorbereitung der Proteinprobe

Zur Elektrophorese wird die LDH völlig denaturiert und in ihre Untereinheiten aufgespalten.

Dies geschieht dadurch, daß zu den bei der Bestrahlung entnommenen Proben in einem Reaktionsgefäß eine SDS - Lösung gegeben wird. Die Menge und Konzentration der SDS - Lösung wurde jeweils so gewählt, daß in der zur Elektrophorese gelangenden Lösung eine SDS Konzentration von 1% und eine Enzymkonzentration von 0,5 mg/ml vorlag. Die Mischung wurde nach kräftigem Schütteln für 5 Minuten auf 100°C erhitzt.

Die Hälfte der Proben wurde außer mit SDS auch noch mit 1% Mercaptoäthanol versetzt, um eventuell bei der Bestrahlung entstandene Disulfidbrücken zu spalten, und dann ebenfalls für 5 Minuten auf 100°C erhitzt. Die Verdünnung der Proben nach der Bestrahlung auf eine Konzentration von 0,5 mg Protein pro ml Lösung wurde durchgeführt, um bei der Elektrophorese vergleichbare Bedingungen zu erhalten.

Die erhitzten Proben wurden bei Zimmertemperatur abgekühlt und entweder sofort zur Elektrophorese verwendet oder bis zum späteren Gebrauch im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

2.2.3.4 Elektrophorese

2.2.3.4.1 Aufbau

Zur Elektrophorese wurde ein Gerät von Shandon verwendet, in dem die Elektrophorese für 8 Röhrchen gleichzeitig durchgeführt werden kann.

Es besteht aus einem Netzteil, das es erlaubt Strom oder Spannung, je nach Bedarf, zu variieren und aus dem Behälter, der zur Aufnahme der Röhrchen dient. (Siehe Abb. 5)

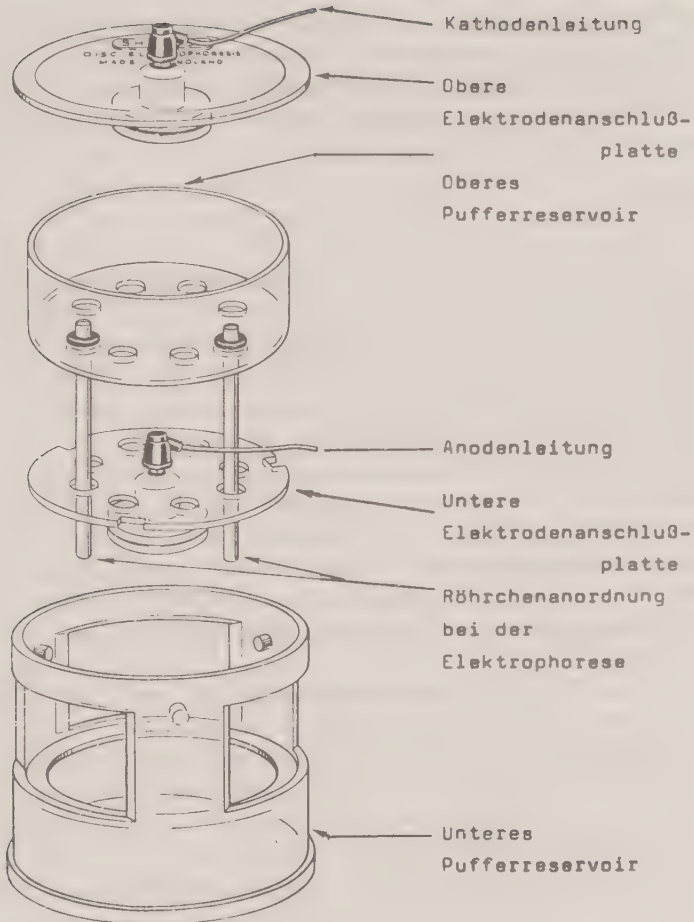


Abb. 5 Elektrophoresegerät

Der Elektrophoresebehälter besteht aus Plexiglas, stellt einen Zylinder mit einem oberen und einem unteren Pufferreservoir dar, in den jeweils Kathode beziehungsweise Anode in Form eines Platindrahtes getaucht werden. Das obere Pufferreservoir ist durch Gummidichtungen, die fest um die eingesteckten Glasröhrchen schließen, gegen Pufferverlust gesichert.

2.2.3.4.2 Durchführung

Der oben zur Gelherstellung beschriebene Phosphatpuffer wurde 1 : 3 mit Aqua dest. verdünnt, um die Leitfähigkeit in Puffer und Gel annähernd gleich zu halten, da bei höherer Pufferkonzentration das Gel bei sonst gleichen Bedingungen zu stark erwärmt wurde und die Qualität der Ergebnisse darunter litt.

Der verdünnte Puffer wurde in das untere Reservoir eingefüllt, die Kathode angebracht und das Oberteil des Gerätes mit den 8 eingesteckten Glasröhrchen, aus denen vorher das Wasser ausgeschüttelt wurde, aufgesetzt. Dabei war darauf zu achten, daß am unteren Ende der Gele keine Luftblasen hängen blieben, die den Lauf beeinträchtigen konnten.

Nun wurden mit der Mikropipette oben auf jedes Gel 20 µl der Probe aufgetragen, dazu noch 5 µl Bromphenolblau, um die Wanderungsfront im Gel sichtbar zu machen und eine geringe Menge Sephadex G 200, um eine Rückdiffusion der Probe in das obere Pufferreservoir zu verhindern.

Bei Proben, die vor dem Erhitzen mit Mercaptoäthanol versetzt wurden, wurden jetzt nochmals 5 ml Mercaptoäthanol aufgetragen, um während des Elektrophoreselaufs

sicher eine Reoxidation zu verhindern.

Jetzt wurde das obere Pufferreservoir vorsichtig gefüllt, um die Proben nicht aus den Röhrchen zu schwemmen. Sodann wurde die Kathode angebracht und ein Strom von 64 mA an das System angelegt, so daß über jedes Gel ein Strom von 8 mA floß und eine Spannung von 60 Volt vorlag.

Versuche mit einem anfänglich geringeren Strom und einer allmählichen Steigerung, um am Gelanfang eine bessere Konzentrierung des Proteins und damit schärfere Banden zu erhalten, brachten keine Verbesserung der Ergebnisse. Nach etwa 3 Stunden Laufzeit war die Front des Farbstoffs 5 mm vor dem Gelende angelangt und die Elektrophorese wurde beendet.

Die Laufzeit schwankte aus nicht genau zu klärenden Gründen bis zu 30 Minuten. Es wäre denkbar, daß die Erwärmung der Gele in Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur die Leitfähigkeit der Gele und damit die Wanderungsgeschwindigkeit der Ionen beeinflusste. Sofort nach der Elektrophorese wurden die Gele mit Hilfe eines exakt in die Glasröhrchen passenden Glasstabes aus diesen herausgestoßen und gefärbt.

2.2.3.5 Färben der Gele

Nach dem Lösen aus den Glasröhrchen wurden die Gele in ein Reagenzglas gegeben, in dem sich 7 ml Färbelösung befanden.

Die Färbelösung wurde nach folgendem Rezept hergestellt :

Coomassie Brilliant Blue R 250 (51)	1,25	g
Methanol	227	ml
Eisessig	46	ml
Aqua dest.	auf 500	ml

Die Färbung wurde bei Raumtemperatur über 2 Stunden durchgeführt, da dies als die günstigste Färbezeit angesehen wird und sich bei längerer Färbezeit die Ergebnisse nicht verbessern ließen, bei kürzeren Zeiten und gleicher Temperatur dagegen schlechtere Ergebnisse resultierten (37,38).

Färben bei 50°C über 60 Minuten führte zwar zu gleich guten Ergebnissen, wurde aber nur versuchsweise durchgeführt.

2.2.3.6 Entfärben der Gele

Die Entfärbelösung wurde nach folgender Vorschrift hergestellt :

Methanol	50	ml
Eisessig	75	ml
Aqua dest. auf	1000	ml

Die Gele wurden nach dem Färben kurz gewaschen und in Reagenzgläser mit je 20 ml Entfärbelösung gegeben. Die Gläser wurden bei 50°C in ein Schüttelwärmebad gestellt und verblieben dort bei einmaligem Wechsel der Entfärbelösung für 2 Tage, bis das Gel bei Betrachtung mit dem Auge keine Grundfärbung mehr zeigte. Daß diese Entfärbezeit ausreichend war, zeigte sich auch an der bei der Photometrie nahe dem Nullpunkt gelegenen Grundlinie.

Anfangs wurde der Entfärbelösung der Ionenaustauscher AG 501 X8 zugegeben, dann aber weggelassen, weil wir keinen Unterschied im Effekt erkennen konnten.

2.2.3.7 Eichung nach dem Molekulargewicht

Um bei der Versuchsdurchführung und Auswertung die erhaltenen Proteinbanden zuordnen zu können, war es notwendig, den verschiedenen Wanderungstrecken die entsprechenden Molekulargewichte zuzuordnen.

Dies geschah in der Weise, daß verschiedene Proteine mit bekanntem Molekulargewicht der Elektrophorese unterzogen wurden.

Bei der Auftragung des Logarithmus des Molekulargewichts über der Wanderungstrecke erhält man eine Gerade, die jedem Punkt des Gels ein bestimmtes Molekulargewicht zuweist.

2.2.3.8 Reproduzierbarkeit

Nach Untersuchungen von Weber und Osborn (37) und nach eigenen Messungen betragen die Abweichungen in der Mobilität während eines Elektrophoreselaufs höchstens 5%. Bei verschiedenen Läufen, bei denen Gelzusammensetzung, Elektrophoresezeit, Umgebungstemperatur und andere Parameter nicht identisch waren, können Abweichungen bis zu 10% auftreten.

Diese Abweichungen waren deshalb nicht störend, weil bei jedem Elektrophoreselauf zwei Röhrchen mit nativer LDH bestückt wurden, wodurch ein Bezugspunkt gegeben war, nach dem die Molekulargewichte der übrigen Banden bestimmt werden konnten.

2.2.4 Auswertung der gefärbten Gele

2.2.4.1 Photometrische Densitometrie

Die Auswertung erfolgte durch die Messung der Extinktion von CBB im Gel bei 550 nm, da CBB hier sein Absorptionsmaximum hat.

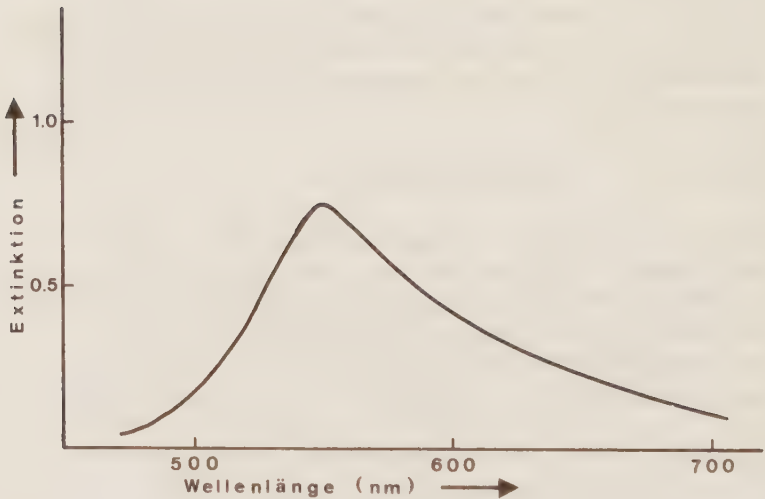


Abb. 6 Absorption von CBB

CBB wird durch elektrostatische Kräfte an Protein gebunden. Die Farbausbeute mit CBB ist ein guter Parameter für die Proteinmenge im Gel, da nachgewiesen

werden konnte, daß es bei der Messung linear mit der Proteinzunahme ansteigt (siehe Ergebnisse).

Die Auswertung ging so vor sich, daß das Gel in eine Küvette gelegt wurde, die Küvette mit Wasser aufgefüllt und in den Gel - Scanner in das Photometer eingesetzt wurde. Diese Messungen wurden mit dem Spektrometer von Beckman durchgeführt. Die entsprechende Wellenlänge wurde eingestellt und ein Papierschreiber an das Photometer angeschlossen, der die Extinktion im Gel linear aufzeichnete, wobei der Vollausschlag durch eine Extinktionserhöhung auf 2,0 bewirkt wurde.

Der Papiervorschub und der automatisch erfolgende Gelvorschub wurden so eingestellt, daß 1 cm Gel einer Strecke von 1 Inch auf dem Papier entsprach. Die Schreibung erfolgte so, daß die Gele den Lichtspalt, an dem die Extinktion gemessen wurde, immer in der gleichen Richtung passierten.

Das Gel wurde mit einer Geschwindigkeit von 2 cm pro Minute vorgeschoben. Bei dieser Geschwindigkeit war die Schreibung noch exakt, während bei schnellerem Vorschub die Trägheit des Schreibers eine der Extinktion nicht genügend genau folgende Kurve bewirkte.

Der Extinktionsnullpunkt wurde auf Wasser eingestellt, wobei bei genügend langer Entfärbung die Extinktion des Gels nur wenig über der Null - Linie lag.

Bei zu geringer Entfärbung der Gele wurde auch außerhalb von 550 nm gemessen, wodurch auch in diesen Fällen eine quantitative Auswertung erfolgen konnte.

2.2.4.2 Molekulargewichtsbestimmung

Zur Festlegung des Molekulargewichts wurde die Strecke vom Gelanfang bis zum Maximum des betreffenden Peaks gemessen. Die Abweichungen bei den verschiedenen Läufen wurden dadurch korrigiert, daß die Spitze des nativen Peaks als Bezugspunkt innerhalb eines Versuchs gewählt wurde und die anderen Peaks darauf bezogen wurden.

Die Elektrophorese von bestrahlter LDH und Eichproteinen mußte in einem Lauf durchgeführt werden, um eine genaue Zuordnung der Produkte treffen zu können, da bei verschiedenen Elektrophoreseläufen eine Beurteilung des Molekulargewichts durch die abweichende Laufstrecke nicht so exakt möglich gewesen wäre.

2.2.4.3 Beurteilung des Färbeverhaltens

Die Anfärbung der Gele war bei den verschiedenen Versuchen unterschiedlich, so daß eine direkte Vergleichsmöglichkeit der photometrischen Diagramme der verschiedenen Versuche nicht gegeben war. Um diesen Faktor zu beseitigen und eine quantitative Beurteilung der Proteinabnahme durchführen zu können, mußten die erhaltenen Kurven umgerechnet werden.

2.2.4.4 Umrechnung der planimetrierten Flächen

Die Photometerdiagramme wurden zuerst mit einem Planimeter ausgemessen, das heißt, daß die Flächen der mit dem Photometer ermittelten Peaks bestimmt wurden.

Diese Flächenwerte konnten in einem Diagramm den Bestrahlungszeiten zugeordnet werden, wobei sich eine lineare Abhängigkeit ergab. Da die Absolutwerte aber von Versuch zu Versuch voneinander abwichen, ergab sich die Notwendigkeit, die gemessenen Flächenwerte auf Prozentwerte umzurechnen, wobei die Fläche der unbestrahlten Probe jeweils mit 100% festgesetzt wurde.

Im Diagramm lagen diese Werte nicht genau auf einer Linie, weshalb mit dem Rechner die Gerade bestimmt wurde, die mit der besten Korrelation durch die erhaltenen Punkte zu legen war. Die Steigungen der so erhaltenen Geraden konnten jetzt miteinander verglichen werden.

2.2.5 Qualitative Auswertung

Die qualitative Auswertung erfolgte durch Messung der Laufstrecke und Zuordnung zum Molekulargewicht mit Hilfe der Eichgeraden, die durch Elektrophorese von Eichproteinen aufgestellt wurde.

2.2.6 Quantitative Auswertung

Die bei der Planimetrie erhaltenen und mittels Rechner bestimmten Flächenänderungen unter Bestrahlung wurden miteinander verglichen. Es sollte insbesondere gezeigt werden, welche Unterschiede sich hinsichtlich des Abbaus der LDH und der Entstehung von Aggregaten oder Bruchstücken bei verschiedenen Enzymkonzentrationen und unter verschiedenen Gasbedingungen zeigten.

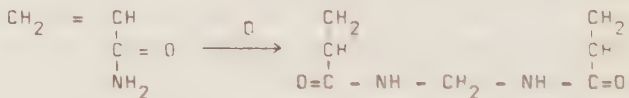
3 VERSUCHSDURCHFÜHRUNG UND ERGEBNISSE

3.1 Grundlagen der SDS - PAGE

Für die vorliegende Arbeit wurde das Standard SDS - Phosphat - System verwendet, da es für die Erstanwendung der Elektrophorese am geeignetsten erschien und sich bei vielen Autoren als gut brauchbar erwies (33,34,39). Das Gelsystem ist homogen und verzichtet damit auf den Gebrauch eines Sammelgels, sowie auf einen Konzentrationsgradienten, was bei der Einführung dieser Arbeitstechnik ratsam erschien.

Polyacrylamidgel entsteht bei der Polymerisierung von Acrylamid und der Quervernetzung mit MBA, wobei Ammoniumpersulfat als Sauerstoffdonator die Reaktion katalysiert nach folgender

Polymerisationsreaktion :

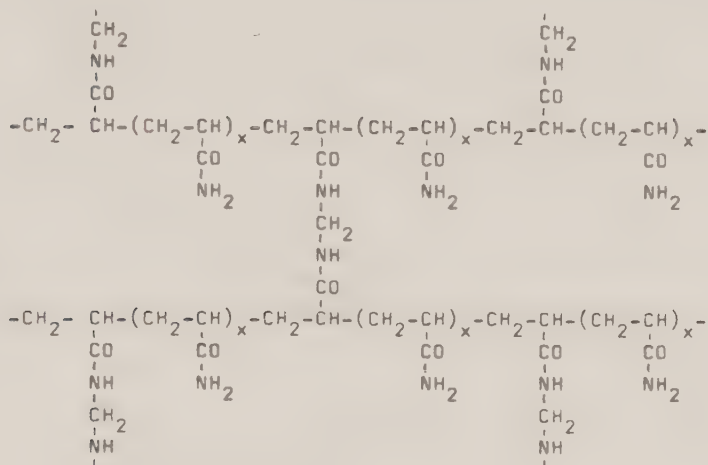


Die Porengröße im Gel wird durch die Konzentration von Acrylamid und Quervernetzer bestimmt.

$$\text{Porengröße } T = (A + Q) / m \cdot 100\%$$

Bei dem verwendeten Gel errechnet sich die Porengröße zu 45 Å.

Das Gel weist nach der Polymerisation folgende Struktur auf :



Die Gelherstellung erforderte eine hohe Präzision, da schon kleine Abweichungen in der Prozedur zu Fehlern im Gel führten.

So mußte besonders auf eine gute Entgasung und Kühlung der Reagenzien geachtet werden, da sonst die Polymerisation zu schnell ablief und in den Glasröhrchen zwischen sehr schnell und langsamer polymerisiertem Gel Grenzflächen auftraten und die Gele dadurch nicht mehr verwertbar waren.

Um an der oberen Gelgrenzfläche eine Meniskusbildung zu vermeiden, wurde sofort nach dem Einfüllen des Gels in die Röhrchen ein Tropfen Wasser aufgetragen.

Nach Ablauf der Polymerisation mußten die Gele feucht gelagert werden, um ein Eintrocknen und Schrumpfen an den Gelen den zu vermeiden.

Bei der SDS - Gelelektrophorese liegen alle Proteine in Form von SDS - Proteinkomplexen vor.

Ein Gramm Protein bindet, unabhängig von der absolut vorhandenen SDS Menge, je 1,4 g SDS und erhält dadurch eine annähernd konstante negative Ladung.

Nach Untersuchungen von Fish, Reynolds und Tanford (40) haben die entstehenden Komplexe Stäbchenform beziehungsweise Ellipsoidform. Man nimmt an, daß eine hydrophobe Wechselwirkung zwischen SDS und den hydrophoben Gruppen des Proteins, die zum größten Teil im Innern des Moleküls liegen, auftritt. Dadurch kommt es zu einer Entfaltung des Moleküls. Durch die Sulfatgruppen des SDS sind die Proteinmoleküle alle negativ aufgeladen. Sind Untereinheiten eines Proteins ursprünglich durch elektrostatische Wechselwirkung miteinander verknüpft, so dissoziieren sie unter dem Einfluß von SDS. Dies ist der Fall bei LDH, die bei Bindung von 1,4 g SDS / g LDH in Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 36 000 zerfällt.

Der kleinere Durchmesser dieses Protein - SDS - Komplexes liegt konstant in der Größenordnung von 18 Å, während die lange Achse vom Molekulargewicht oder der Zahl der Aminosäuren abhängig ist. Daraus darf geschlossen werden, daß bei SDS beladenen Proteinen zwischen der Länge des Moleküls und dem Molekulargewicht eine Korrelation besteht.

SDS beladene Proteine wandern um so weiter zur Anode, je kleiner ihr Molekulargewicht ist. Die Porengröße des Polyacrylamidgels begrenzt die Trennfähigkeit nach oben und unten. Bei dem von uns verwendeten Gel mit einer Acrylamid Endkonzentration von 10% soll eine Trennung von Proteinen zwischen den Molekulargewichten

70 000 und 14 000 möglich sein (37).

Die relative Mobilität der Proteine ergibt sich aus der Ferguson - Gleichung, die 1964 für Stärke - Gel - Elektrophorese aufgestellt und 1968 für die Polyacrylamid Gelelektrophorese von Hedrik und Smith bestätigt wurde (41,42).

$$\log m = \log m_0 - K \cdot T$$

T = Gelkonzentration

K = Verzögerungskonstante = $k_c \cdot \text{Mol.Gew.} + a$

k_c = Quervernetzungs-koeffizient

m = relative Mobilität des Proteins

m_0 = relative Mobilität bei Gel Konzentration 0

Von Shapiro (43) wurde zuerst gezeigt, daß die Mobilität von Proteinen bei der SDS - PAGE in erster Linie vom Molekulargewicht abhängt.

Diese Beobachtung wurde von Weber und Osborn (34) mit einer Untersuchung von 40 Proteinen mit bekanntem Molekulargewicht erhärtet und bestätigt.

Wenn die Molekülform und die Gelfernetzung konstant gehalten werden, dann ist der Logarithmus der relativen Mobilität eine direkte Funktion des Molekulargewichts :

$$\lg MG = bx + k$$

wobei x die Wanderungsstrecke des Proteins im Gel ist.

Diese Gesetzmäßigkeit gilt nur, wenn keine intra-molekularen Quervernetzungen im Molekül vorliegen.

Davies und Stark (44) konnten zeigen, daß durch künstliche chemische Verknüpfungen die SDS Bindung

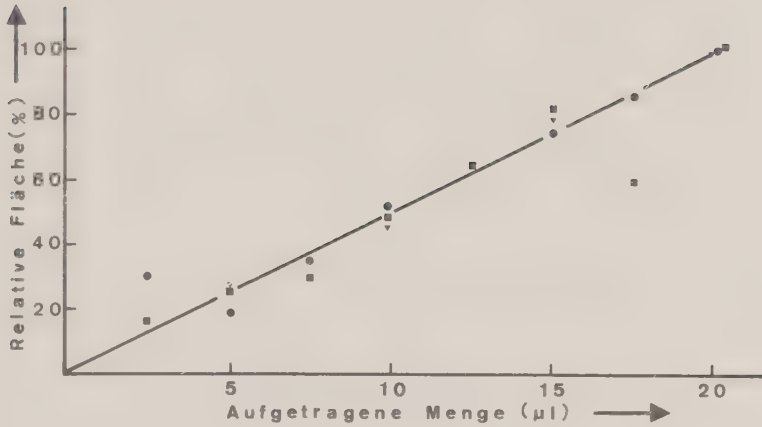
eingeschränkt und dadurch eine Verlangsamung der elektrophoretischen Mobilität erreicht wird, wodurch ein relativ höheres Molekulargewicht vorgetäuscht wird. Eine quantitative Abschätzung für den strahleninduzierten Abbau der LDH wurde auf Grund der Farbausbeute nach CBB - Färbung versucht. CBB wird durch elektrostatische Wechselwirkung an das Protein gebunden. Um zu prüfen, ob es einen linearen Zusammenhang zwischen Farbausbeute und aufgetragener Proteinmenge gibt, wurde folgender Versuch gemacht: LDH wurde in Mengen von 2,5 µg - 20 µg elektrophoretisch aufgetrennt und nach Färbung densitometrisch ausgemessen. Die planimetrisch bestimmten Flächen sind ein Maß für die Farbausbeute.

Trägt man die so erhaltenen Flächenwerte über der Proteinmenge auf, so bekommt man das in Abb.7 erhaltene Resultat. Diese Linearität wurde auch bei bestrahlten LDH - Proben mit unterschiedlicher Konzentration überprüft.

Dabei wurde, wegen der nach Bestrahlung erhöhten Grundanfärbung der Gele, die nicht nur durch die Proteinmenge auf dem Gel bedingt sein konnte, sondern auch durch die Färbeeigenschaften von CBB beeinflusst wurde, nur der Peak der nativen LDH ausgemessen und für den Nachweis der linearen Anfärbung verwendet.

3.2 Allgemeines zur Gewinnung der Untersuchungsergebnisse an den bestrahlten Proben

Die bei der Bestrahlung entnommenen Proben von je 100 µl wurden mit SDS - Lösung soweit verdünnt, daß sich eine Endkonzentration von 0,5 mg Protein / ml Lösung ergab. Die SDS Konzentration wurde auf 1% eingestellt.



- = 1 mg/ml Nativ
- = 1 mg/ml 60 Minuten bestrahlt
- ▼ = 0,5 mg/ml 60 Minuten bestrahlt

Abb. 7 Linearität zwischen der auf das Gel aufgetragenen Menge LDH und der bei der Planimetrie erhaltenen relativen Fläche (20 µl = 100%)

Diese Verdünnung wurde deshalb durchgeführt, damit ein SDS / LDH Verhältnis von 1,8 g / 1,0 g erreicht wurde, wobei alle Proteinmoleküle voll entfaltet sind. Zum anderen mußte durch die Verdünnung die SDS Konzentration nicht über 1% angehoben werden und konnte so unter der für Micellenbildung kritischen Konzentration gehalten werden. Ebenso war dies für die weiteren Arbeiten günstig, da Elektrophorese und photometrische Auswertung in der gleichen Weise durchgeführt werden konnten und so besser vergleichbare Ergebnisse resultierten als bei Veränderung anderer Parameter.

Pro Gel wurden zur Elektrophorese 20 µl der Enzymlösung aufgetragen.

Bei einer Anfangskonzentration von 1,0 mg Protein/ml Lösung ergab das eine auf das Gel aufgetragene Menge von 10 µg. Bei dieser Konzentration ist man, wie im Vorhergehenden gezeigt wurde, im Bereich linearer Korrelation zwischen Farbausbeute und aufgetragener Proteinmenge. Da bei unseren Versuchen die Enzymmenge abnahm, blieb uns für die Beurteilung eine weite Strecke linearer Anfärbung. Ist man gezwungen sehr kleine Volumina (10 µl) zu pipettieren, so kommt es - wie wir zeigen konnten - zu größeren Fehlern.

Nach dem Entfärben der Gele ergab sich bei einer Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml und einer Auftragsmenge von 20 µl bei der photometrischen Densitometrie eine Extinktion, die die maximal möglichen 2 Absorbenseinheiten gerade benötigte.

Ohne Verdünnung der Proben hätte die Menge, die bei gleicher Wellenlänge am Photometer den gleichen Ausschlag erzeugt, zum Beispiel bei einer Konzentration von 3 mg/ml auf das Gel aufzutragen gewesen wäre, nur 3,3 µl betragen dürfen.

Dies hatte aus oben genannten Gründen eine quantitative Auswertung nicht zugelassen.

Für rein qualitative Versuche wurden auch höhere Konzentrationen zur Elektrophorese verwendet, um keine Produkte zu übersehen, die nur in ganz geringem Maß entstanden.

Mit Hilfe von Eichproteinen läßt sich eine gute Zuordnung der in den Versuchen erhaltenen Banden zum Molekulargewicht erhalten.

Bei der quantitativen Auswertung beschränkten wir uns auf die Auswertung der Flächenabnahme der Nativbande, da die Flächen der Produkte wegen ihres geringen Ausmaßes und der je nach Bestrahlungszeit unterschiedlich hohen Grundfärbung bei der Planimetrie eine so große Fehlerbreite zeigten, daß eine quantitative Beurteilung nicht sinnvoll erschien.

Um die Abnahme des nativen Peaks bei Bestrahlung zu bestimmen, wurde die Fläche der unbestrahlten Probe als 100% Wert festgesetzt und aus den zugehörigen Werten der bestrahlten Proben die Steigung berechnet. Dabei ergaben sich bei linearer Auftragung Gerade, deren Steigung von der Proteinkonzentration und der Art der einwirkenden Radikale abhängig war.

3.3 Radiolyse unter Stickstoff

Bei der Bestrahlung von wäßriger Lösung bei pH 7,0 mit Röntgenstrahlen entstehen solvatisierte Elektronen (e^-_{aq}), OH - Radikale und H - Radikale (45).

Die G - Werte (pro 100 Elektronenvolt entstehende Moleküle) betragen für

solvatisierte Elektronen :	2,65
OH - Radikale :	2,70
H - Radikale :	0,55

Die Bestrahlungsversuche an LDH wurden in 0,1 M Phosphatpuffer bei pH 7 durchgeführt. In früheren Versuchen hatte sich gezeigt, daß bei niedrigerer Pufferstärke die LDH bereits ohne Bestrahlung sehr leicht denaturiert (46,47) und sehr leicht aus der Lösung ausfällt. Durch die Gleichartigkeit der Versuchsbedingungen war außerdem auch die Vergleichsmöglichkeit mit früheren Arbeiten gegeben.

Diese bei der Radiolyse des Wassers entstehenden Radikale reagieren mit den in der Lösung befindlichen Stoffen mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Diese Geschwindigkeiten können mittels Pulsradiolyse ermittelt werden und wurden bereits für alle hier interessierenden Reaktionen gemessen. Wir müssen also betrachten, welche Reaktionen der Radikale möglich sind und diese nach ihrem Ablauf berechnen. Bei Begasung mit Stickstoff, der inert ist und mit den entstehenden Radikalen nicht reagiert, bleiben für die Radikalreaktionen noch der Puffer und die LDH. Die Geschwindigkeitskonstanten für diese Einzelreaktionen Pseudo - 1. Ordnung werden als K - Werte bezeichnet.

Für die Reaktion von OH - Radikalen und H - Radikalen mit dem verwendeten Puffer und auch mit Distickstoffoxid sind die K - Werte zu klein, um pulsradiolytisch erfaßt zu werden, weshalb wir sie bei unseren Überlegungen außer Acht lassen können.

$$\begin{aligned}
 K(\text{LDH} + e^-_{\text{aq}}) &= 2,4 \cdot 10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \\
 K(\text{LDH} + \text{OH}^-) &= 2,1 \cdot 10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \\
 K(\text{H}_2\text{PO}_4^- + e^-_{\text{aq}}) &= 4,2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \\
 K(\text{N}_2\text{O} + e^-_{\text{aq}}) &= 8,7 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}
 \end{aligned} \quad (48)$$

Die verwendeten Konzentrationen betragen :

$$\begin{aligned}
 \text{LDH} &= 7,14 \cdot 10^{-6} \text{ Mol/l} \\
 \text{H}_2\text{PO}_4 &= 10^{-1} \text{ Mol/l} \\
 \text{N}_2\text{O} &= 0,05 \text{ Mol/l}
 \end{aligned}$$

Unter Stickstoff konkurrieren also LDH und H_2PO_4 um das solvatisierte Elektron nach folgender Gleichung :

$$W_{\text{LDH}+e^-_{\text{aq}}} = \frac{\text{LDH-Konz.} \cdot K(\text{LDH}+e^-)}{\text{LDH-Konz.} \cdot K(\text{LDH}+e^-) + \text{H}_2\text{PO}_4\text{-Konz.} \cdot K(\text{H}_2\text{PO}_4+e^-)}$$

$W_{\text{LDH}+e^-}$ bedeutet die Wahrscheinlichkeit, mit der diese Reaktion stattfindet.

Durch Einsetzen obiger Zahlen erhalten wir folgende Gleichung :

$$\begin{aligned}
 W_{\text{LDH}+e^-_{\text{aq}}} &= \frac{7,14 \cdot 10^{-6} \cdot 2,4 \cdot 10^{11}}{7,14 \cdot 10^{-6} \cdot 2,4 \cdot 10^{11} + 10^{-1} \cdot 4,2 \cdot 10^6} \\
 &= 0,80 ;
 \end{aligned}$$

Bei einer Konzentration von 1 mg LDH / ml reagieren also 80% der solvatisierten Elektronen mit den LDH Molekülen. Die übrigen Elektronen reagieren mit dem Puffer, wobei auf Kosten der solvatisierten Elektronen H - Radikale entstehen (49).

So erhalten die unter Stickstoff mit der LDH reagierenden Radikale folgende G - Werte :

Solvatisierte Elektronen	:	2,12
OH - Radikale	:	2,70
H - Radikale	:	1,08

Unter Stickstoff reagieren diese Primärradikale mit der gelösten LDH.

Bestrahlt man LDH in einer Konzentration von 3 mg/ml unter Stickstoff, so erhält man die in Abb. 8 dargestellten elektrophoretischen Auftrennungen. Daraus ist bereits zu erkennen, daß mit Erhöhung der Energiedosis die Farbausbeute in der Position der nativen LDH - Bande abnimmt. Gleichzeitig verbreitert sich diese Bande. Als Bestrahlungsprodukte erkennt man Proteine, die langsamer als LDH wandern und zum Teil bereits am Gelanfang nachgewiesen werden. Zu einem geringen Teil treten auch Proteinfragmente auf, die schneller zur Anode wandern als LDH. Die gleichen Produkte treten auch auf, wenn man LDH in einer Konzentration von 0,5 mg/ml bestrahlt (siehe Abb. 9). Sie sind aber nur bei Erhöhung der aufgetragenen Menge gut zu erkennen. Um die Molekulargewichte der Bestrahlungsprodukte zu bestimmen, wurde gleichzeitig in einem Elektrophoreseversuch bestrahlte LDH - Proben und Eichproteine aufgetrennt. Das Resultat ist in Abb. 10 dargestellt. Bei allen Konzentrationen lassen sich in der Stellung der Dimeren - LDH (MG=70 000) sowie am Gelanfang Reaktionsprodukte nachweisen. Die Färbung am Gelanfang dürfte von trimeren Molekülen (MG=105 000), höchstens aber von Tetrameren (MG=140 000) verursacht werden, da höhere Aggregate sicher nicht in das Gel einwandern.

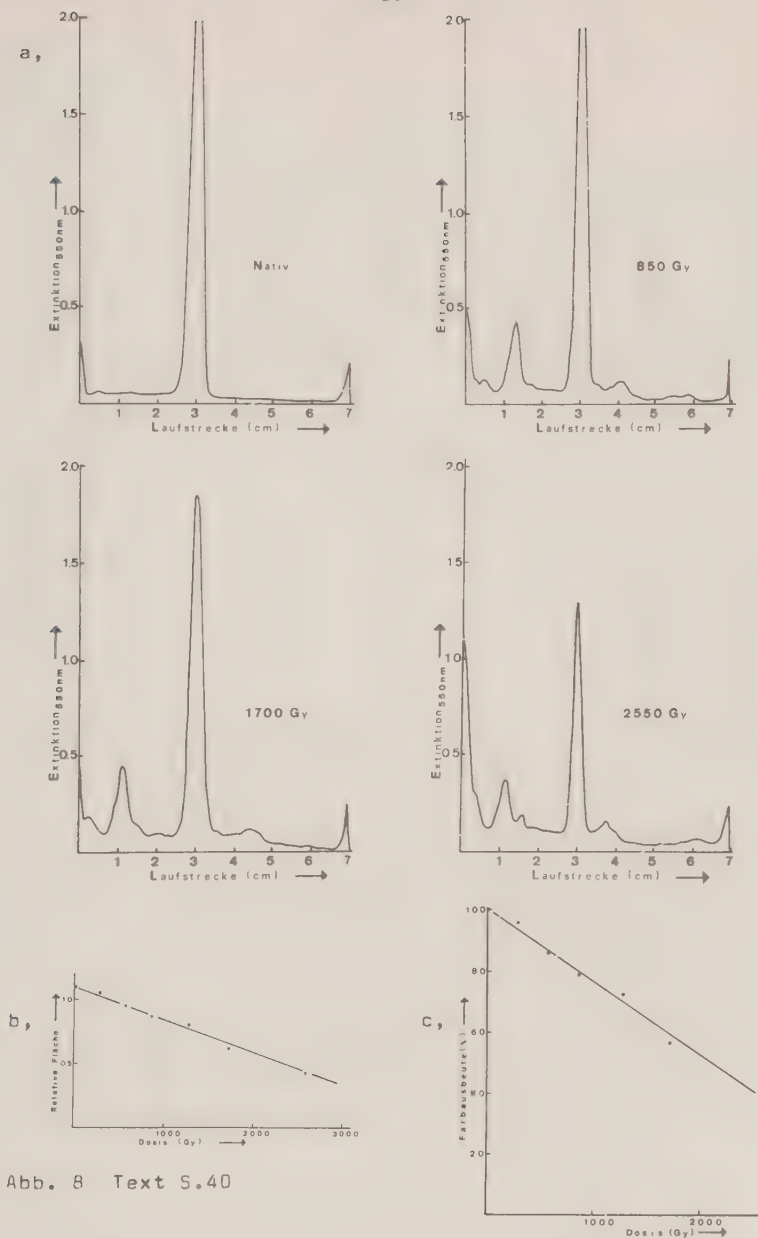


Abb. 8 Text S.40

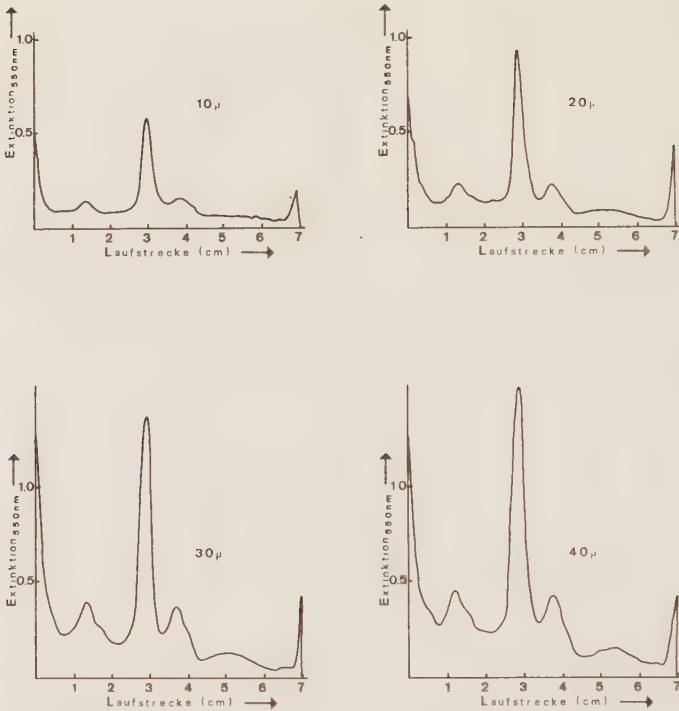


Abb. 9 Mit einer Dosis von 1700 Gray unter N_2
bestrahlte LDH (cLDH = 0,5 mg/ml)
Auftragsmenge von 10 μ l bis 40 μ l

Abb. 8 a, Die mit dem Photometer ermittelten Kurven
von nativer und bestrahlter LDH (3 mg/ml unter N_2)
b, Die mit dem Planimeter ermittelten Flächenwerte
c, Die auf Prozentwerte umgerechnete Kurve

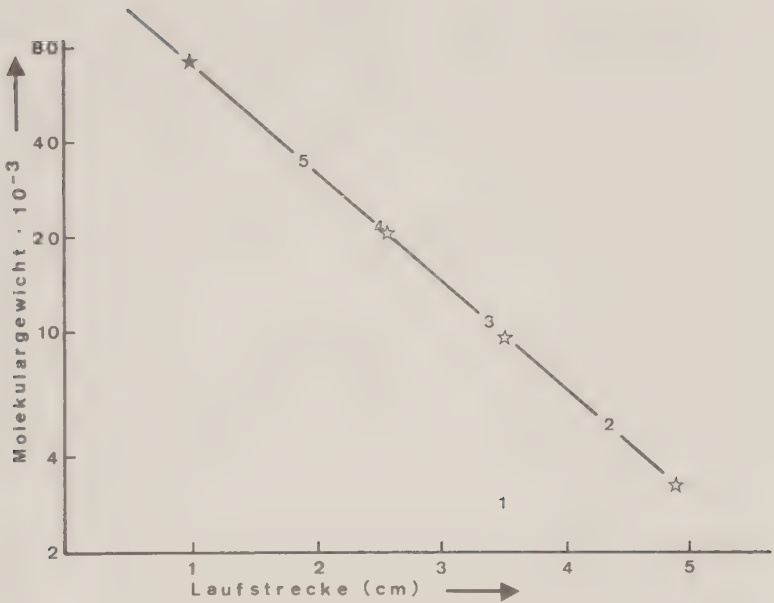


Abb. 10 Eichung des Molekulargewichts mit Eichproteinen

Eichproteine : 1 = MG 3 400
2 = MG 6 500
3 = MG 12 500
4 = MG 21 500
5 = MG 36 000

★ = Aggregat (Dimer)

☆ = Bruchstücke

Bei der Bestrahlung unter Stickstoff zeigte sich, daß die Abnahme des bei der Elektrophorese wie native LDH wandernden Proteins um so größer ist, je kleiner die Proteinkonzentration bei der Bestrahlung war. Die Abbildung 11 kann davon nur einen Eindruck vermitteln. In Abb. 12 sind die densitometrisch und planimetrisch ermittelten Farbausbeuten in Abhängigkeit von der Dosis aufgetragen.

In der Tabelle 1 sind die für die verschiedenen Geraden ermittelten Steigungen und ihre Korrelationsfaktoren angegeben.

Reduziert man die bestrahlten Proben, dann werden alle strahleninduzierten S - S - Brücken zerstört. Dadurch zerfallen Aggregate, die nur über Disulfidbrücken gebunden sind, wieder in die monomeren Einheiten. Aus der Abb. 11 und der Tab. 1 ist zu ersehen, daß nach Reduktion der Disulfidbrücken der Verlust an der Farbausbeute von Molekülen in der Position der LDH geringer wird.

Etwa 10% der Produkte dürften über Disulfidbrücken gebunden sein, da bei Reduktion mit Mercaptoäthanol ein um diesen Betrag höher liegender Peak resultiert. Bei diesen Versuchen nimmt die Gesamtfarbausbeute pro Gel ab. Zum Teil ist dies begründet durch Bildung höherer Aggregate, die nicht mehr in das Gel einwandern können und zum Verlust des Proteins führen. Außerdem wurde aber beobachtet, daß es mit steigender Dosis zu einer Erhöhung der Untergrundfärbung kommt. Es besteht die Möglichkeit, daß die Proteine durch intramolekulare Bindungen in ihrer Wanderung so behindert sind, daß keine abgegrenzten Peaks mehr entstehen. Die undifferenzierte

Anhebung der Untergrundfärbung kann auch durch diese Moleküle verursacht werden. Es ist aber auch möglich, daß sehr viele verschiedene Bestrahlungsprodukte entstehen, die nicht mehr trennbar sind und nur eine allgemeine Färbung hervorrufen.

Tabelle 1 (Bestrahlung unter N_2)

Konzentration (mg/ml)	Steigung m	Korrelationsfaktor r
0,5	1,05	0,99
0,5 reduziert	1,10	0,96
1,0	1,10	0,97
1,0 reduziert	1,18	0,93
3,0	1,49	0,95
3,0 reduziert	1,61	0,97

Tabelle 2 (Bestrahlung unter N_2O)

Konzentration (mg/ml)	Steigung m	Korrelationsfaktor r
0,5	0,68	0,98
0,5 reduziert	0,72	0,97
1,0	0,80	0,93
1,0 reduziert	0,93	0,89
2,8	1,43	0,97

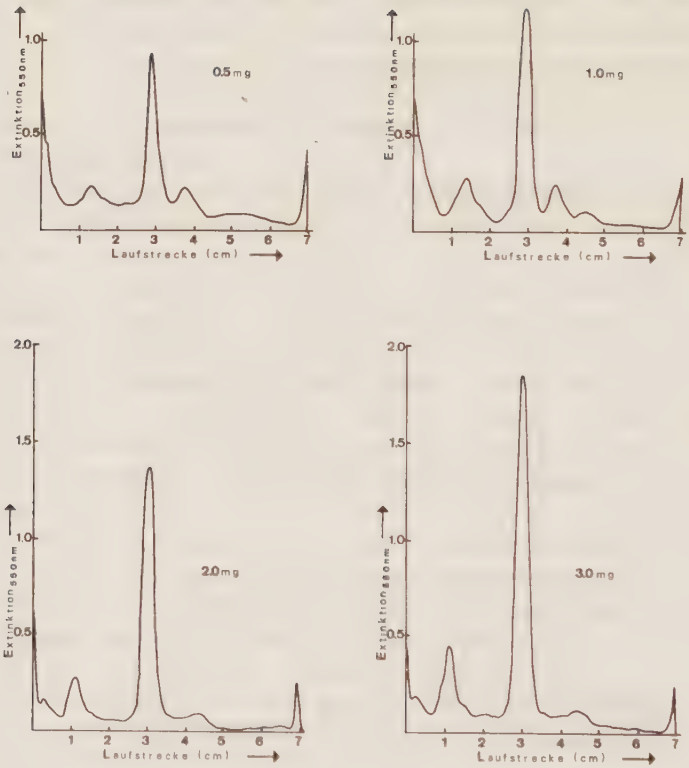


Abb. 11 Vergleich der unter Stickstoff bestrahlten verschiedenen Konzentrationen bei 1700 Gray.

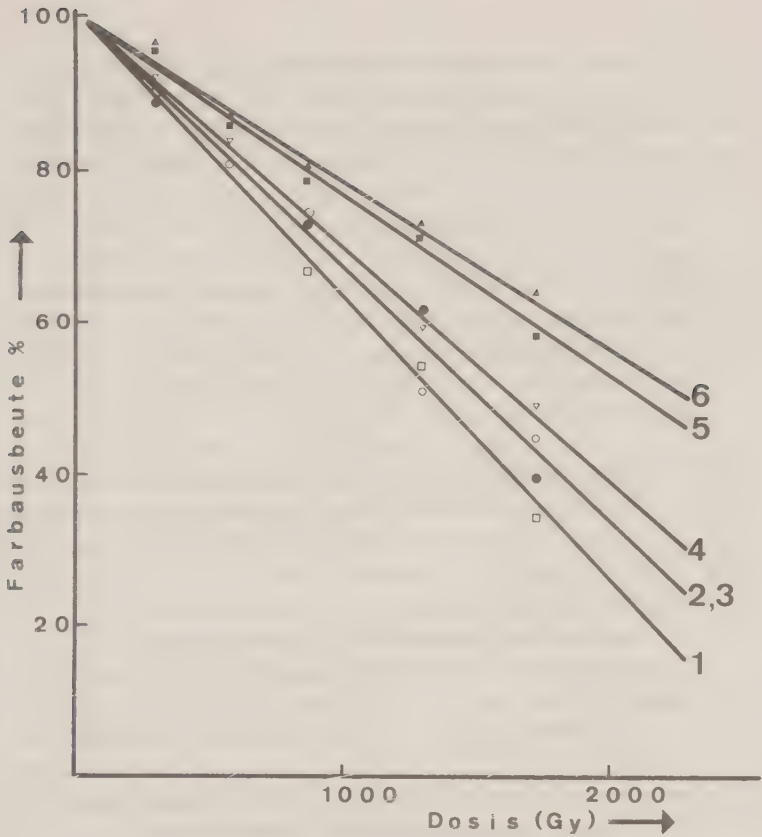


Abb. 12 Verhalten der LDH bei Bestrahlung unter N_2 in Abhängigkeit von der Konzentration und der Reduktion durch Mercaptoäthanol (x).
1) 0,5 mg/ml 2) 0,5 mg/ml (x) 3) 1,0 mg/ml
4) 1,0 mg/ml (x) 5) 3,0 mg/ml 6) 3,0 mg/ml (x)

3.4 Radiolyse unter Distickstoffoxid

Unter Distickstoffoxid dagegen werden die solvatisierten Elektronen zu OH - Radikalen umgewandelt (50)



Diese Reaktion verbraucht 99,51% der solvat. Elektronen, so daß wir unter N_2O folgende G - Werte erhalten :

Solvatisierte Elektronen	: 0,01
OH - Radikale	: 5,34
H - Radikale	: 0,55

$$\begin{aligned}
 G_{\text{N}_2\text{O}+e^-} &= \frac{c(\text{N}_2\text{O}) \cdot k(\text{N}_2\text{O}+e^-)}{c(\text{N}_2\text{O}) \cdot k(\text{N}_2\text{O}+e^-) - c(\text{LDH}) \cdot k(\text{LDH}+e^-) - c(\text{H}_2\text{O}_2) \cdot k(\text{H}_2\text{O}_2+e^-)} \\
 &= \frac{0,05 \cdot 8,7 \cdot 10^9}{0,05 \cdot 8,7 \cdot 10^9 + 7,14 \cdot 10^{-6} \cdot 2,4 \cdot 10^{11} + 4,2 \cdot 10^6} \\
 &= 0,9951 ;
 \end{aligned}$$

Das entspricht einer Reaktionswahrscheinlichkeit von 99,51% für die Reaktion des solvat. Elektrons mit Distickstoffoxid.

Unter Distickstoffoxid erfolgt die Radiolyse der LDH im wesentlichen durch die Reaktion der $\text{CH}^\cdot$ - Radikale. Der Beitrag der $\text{H}^\cdot$ - Radikale an den Veränderungen ist etwa 10%.

Die Bestrahlungsergebnisse unter Distickstoffoxid boten zu denen unter Stickstoff kaum Unterschiede.

Es traten die gleichen Bestrahlungsprodukte auf. Aus diesem Grund wurde auf die Abbildung von Densitometerkurven verzichtet, da sie rein optisch keine Unterschiede zu Abb. 11 bieten.

Ebenso wie unter Stickstoff nahm der native Peak um so schneller ab, je geringer die Enzymkonzentration war. Während bei einer LDH Konzentration von 2,8 mg/ml eine Dosis von 2137 Gray nötig war, um 50% der nativen Bande abzubauen, so genügten bei 0,5 mg/ml für den gleichen Effekt schon 997 Gray, also weniger als die Hälfte (siehe Abb. 13).

Das Auftreten von Disulfidbrücken bewegt sich ebenfalls in der Größenordnung wie unter Stickstoff.

Wir wollen darauf erst bei der Berechnung der G - Werte im folgenden Punkt eingehen.

3.5 Vergleich der Ergebnisse bei Bestrahlung unter Stickstoff und unter Distickstoffoxid

Zum Vergleich der Ergebnisse bei Bestrahlung unter Stickstoff und Distickstoffoxid wurden die Mittelwerte aus mehreren Versuchen bei der jeweiligen Proteinkonzentration gebildet.

Es zeigt sich, daß unter Distickstoffoxid stets ein stärkerer Abfall der nativen LDH zu verzeichnen ist als unter Stickstoff.

Unter Distickstoffoxid kommen doppelt so viel OH - Radikale mit dem Enzym zur Reaktion wie unter Stickstoff und es gibt keine hydratisierten Elektronen, die mit der LDH reagieren.

Daraus schließen wir, daß der Abbau der nativen LDH zum größten Teil durch OH - Radikale bedingt wird.

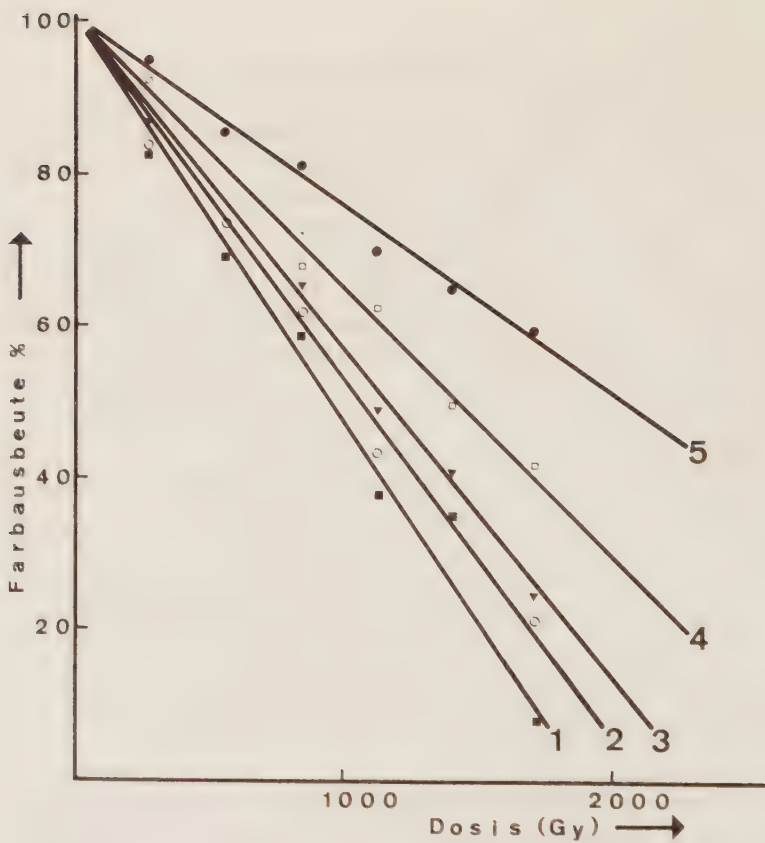


Abb. 13 Abbau der LDH bei Bestrahlung unter N_2O in Abhängigkeit von der Konzentration und der Reduktion durch Mercaptoäthanol (x).
1) 0,5 mg/ml 2) 1,0 mg/ml 3) 0,5 mg/ml (x)
4) 1,0 mg/ml (x) 5) 2,8 mg/ml

Abbildung 14 zeigt außerdem, daß dieser Effekt um so größer wird, je kleiner die Proteinkonzentrationen sind. Während bei einer Konzentration von 1 mg/ml und einer Dosis von 2000 Gray die Restmenge unter Stickstoff noch doppelt so hoch ist wie unter Distickstoffoxid, so ist bei einer Konzentration von 3 mg/ml fast kein Unterschied mehr zwischen den Bestrahlungsbedingungen festzustellen.

Zur Verdeutlichung der Wirksamkeit der Radikale sollen die G - Werte unter den verschiedenen Bedingungen berechnet werden, die zeigen, wieviele Moleküle/100 eV abgebaut werden.

Wir beziehen uns dabei auf die D_{37} , bei der 63% der ursprünglich vorhandenen Moleküle verändert sind. Dadurch wird der Vergleich mit den G - Werten für die Aktivität ermöglicht, da diese ebenfalls nach der D_{37} bestimmt wurden.

Die G - Werte errechnen sich nach folgender Gleichung :

$$G_{\text{LDH-Abbau}} = \frac{\% \text{ Abbau der LDH} \cdot c_{\text{LDH}}(\text{Mol/g}) \cdot N_L \cdot \text{LDH}(\text{mg/ml})}{D_{37}(\text{Gray}) \cdot \text{eV/g}}$$

Die Enzymkonzentration wird mit Hilfe der Zahl von Avogadro von Mol/Liter auf die Zahl der Moleküle pro Liter umgerechnet.

$$(N_L = 6,023 \cdot 10^{23} \text{ Moleküle} \cdot \text{Mol}^{-1})$$

Die Dosis in Gray läßt sich auf Elektronenvolt pro Gramm umrechnen.

$$(1 \text{ Gray} = 6,24 \cdot 10^{15} \text{ eV/g})$$

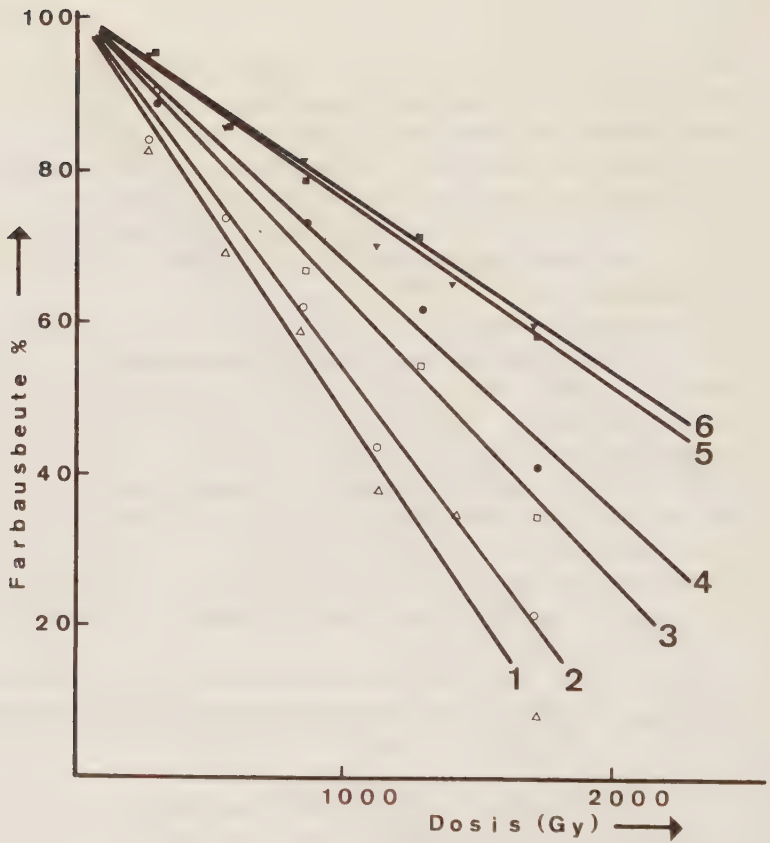


Abb. 14 Vergleich gleicher LDH Konzentrationen
bei Bestrahlung unter N_2 und N_2O
1) 0,5 mg/ml (N_2O) 2) 1,0 mg/ml (N_2O)
3) 0,5 mg/ml (N_2) 4) 1,0 mg/ml (N_2)
5) 2,8 mg/ml (N_2O) 6) 3,0 mg/ml (N_2)

So kann die D_{37} in Gray in die Gleichung eingesetzt werden.

Einer LDH Lösung von 1 mg/ml entspricht die Menge von $7,14 \cdot 10^{-9}$ Mol/g Lösung.

Diese Werte können wir in obige Gleichung einsetzen :

$$G_{\text{LDH-Abbau}} = \frac{0,63 \cdot 7,41 \cdot 10^{-9} \cdot 6,023 \cdot 10^{23} \cdot 10^2 \cdot E}{D_{37}(\text{Gray}) \cdot 6,24 \cdot 10^{15}}$$

$$= \frac{43,4 \cdot E}{D_{37}}$$

E = LDH Konzentration in mg/ml

Durch Einsetzen der Enzymkonzentration und der D_{37} in obige Gleichung lassen sich die in Tabelle 3 dargestellten Werte errechnen.

Aus der Tabelle wird deutlich, daß der Abbau der nativen LDH unter Distickstoffoxid den unter Stickstoff deutlich übertrifft. Dieser Unterschied fällt um so höher aus, je kleiner die Konzentration ist. So beträgt der Mehrabbau unter Distickstoffoxid bei einer Enzymkonzentration von 0,5 mg/ml 54%, während dieser Wert bei 3 mg/ml auf nur noch 9% gesunken ist. Der Anteil der Disulfidbrücken (S - S Anteil) steigt mit der Konzentration etwas an.

Tabelle 3

cLDH mg/ml	Gas	red.	D ₃₇ (Gy)	G _{Abbau}	G _{S-S-Bindung}	% Agg. S-S
0,5	N ₂	n.r.	1850	0,0117	0,0006	5
0,5	N ₂	r.	1950	0,0111		
1,0	N ₂	n.r.	1950	0,0222	0,0015	7,5
1,0	N ₂	r.	2100	0,0206		
3,0	N ₂	n.r.	2650	0,0491	0,0034	7,5
3,0	N ₂	r.	2850	0,0456		
0,5	N ₂ O	n.r.	1220	0,0177	0,0005	2,8
0,5	N ₂ O	r.	1260	0,0172		
1,0	N ₂ O	n.r.	1430	0,0303	0,0037	13,9
1,0	N ₂ O	r.	1630	0,0266		
2,8	N ₂ O	n.r.	2550	0,0510		

n.r. = nicht reduzierte Proben

r. = reduzierte Proben

Die beiden letzten Spalten zeigen den Anteil der intermolekularen S-S Bindungen an der Aggregation.

3.6 Vergleich der Ergebnisse mit den Dosis- Effekt- Kurven vorhergehender Arbeiten

Die Dosis- Effekt- Kurven sind wegen ihres logarithmischen Verlaufs nicht direkt mit den linearen Kurven der Flächenmessung zu vergleichen.

So konnten nur jeweils punktuelle Vergleiche angestellt werden. Dabei zeigte sich, daß die Menge des im nativen Peak gefundenen Proteins sehr gut mit der Aktivität korreliert, wenn auch der Aktivitätsverlust dem Mengenverlust des nativen Proteins vorseilt. Auch hier ist ein Zusammenhang mit der Konzentration gegeben.

So beträgt die Restaktivität bei Bestrahlung von 0,5 mg/ml mit 1000 Gray unter Distickstoffoxid nur 10% der Menge des nativen Peaks, während bei einer Anfangskonzentration von 3 mg/ml bei gleicher Dosis unter Stickstoff die Restaktivität noch 90% der Menge des nativen Peaks ausmacht.

In Tabelle 4 ist die Restaktivität in Bezug auf die Restmenge des nativen Peaks in Prozent aufgetragen, das entspricht der spezifischen Aktivität des Enzyms. Die Tabelle 4 zeigt, daß mit der Konzentration die Korrelation zwischen Aktivität und Menge des Restpeaks in der Lage der nativen LDH zunimmt.

Die aus den Arbeiten der in Abbildung 15 dargestellten Dosis- Effekt- Kurven entnommenen G - Werte werden in Tabelle 5 mit den G - Werten für den Abbau verglichen. Daraus ist zu ersehen, daß der Unterschied zwischen Inaktivierung und Abbau der nativen LDH mit steigender Konzentration immer kleiner wird.

Tabelle 4

c LDH mg/ml	Dosis (Gy)	1000	1500	2000	2500
Bestrahlung unter Stickstoff					
3,0		90	90	90	90
1,0		65	56	47	45
Bestrahlung unter Distickstoffoxid					
1,0		46	35	0	0
0,5		11	0	0	0

Tabelle 5

G _{Inaktivierung}	G _{Abbau}	Differenz	c LDH	Gas
0,048 (22)	0,047	0,001	3,0 mg/ml	N ₂
0,035 (23)	0,021	0,014	1,0 mg/ml	N ₂
0,061 (24)	0,028	0,033	1,0 mg/ml	N ₂ O
0,061	0,017	0,044	0,5 mg/ml	N ₂ O

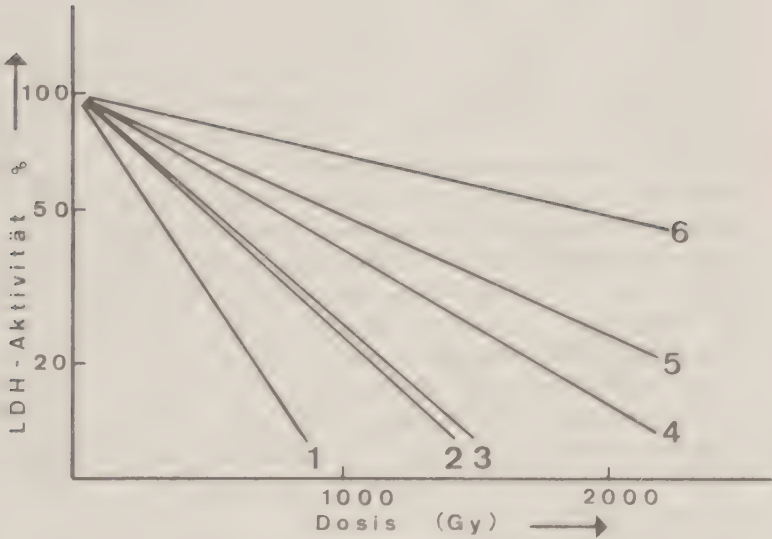


Abb. 15 Dosis - Effekt - Kurven früherer Arbeiten, die unter den Bestrahlungsbedingungen unserer Arbeit ermittelt wurden.

- 1) 0,5 mg/ml unter ^{60}Co (Zahn, 24)
- 2) 1,0 mg/ml unter ^{60}Co (Metzger, 21)
- 3) 1,0 mg/ml unter ^{60}Co (Zahn)
- 4) 1,0 mg/ml unter ^{60}Co (Reuten, 23)
- 5) 1,0 mg/ml unter ^{60}Co (Metzger, 21)
- 6) 3,0 mg/ml unter ^{60}Co (Metzger, 21)

Der G - Wert für den Abbau der LDH auf Grund des elektrophoretischen Nachweises zeigt im Bereich von 0,5 - 3,0 mg/ml eine Konzentrationsabhängigkeit.

Bei der Radiolyse von LDH unter Distickstoffoxid war von Zahn (24) gezeigt worden, daß bereits eine Menge über 0,3 mg/ml ausreicht, um alle Primärradikale abzufangen bzw. um einen konstanten G - Wert für die Inaktivierung zu erreichen. Kommt es durch die Reaktion der Primärradikale zu einer Modifikation der LDH ohne starke Größenveränderung des entsprechenden SDS - LDH - Komplexes, so wird bei dem hier angewendeten Elektrophoreseverfahren die LDH als nicht abgebaut gemessen. Erst durch starke Größenveränderungen des Moleküls, wie sie bei den untersuchten Bestrahlungsbedingungen vor allem durch die Aggregation auftraten, findet ein Verlust von Protein in der Position der LDH - Unter-einheit statt. Da dieser Verlust mit der Konzentration der LDH ansteigt, kann man annehmen, daß es bei hoher Proteinkonzentration weniger zu chemischen Modifikationen ohne Vergrößerung der Moleküle als vielmehr zur Aggregation kommt.

In der Abbildung 16 wird gezeigt, daß im Gegensatz zur Inaktivierung, die bereits ab 0,3 mg LDH/ml konstante G - Werte zeigt, die G - Werte für den Abbau erst bei einer Konzentration von 3,0 mg/ml die Inaktivierungs-G - Werte erreichen.

Ebenso wie bei der Inaktivierung liegen die G - Werte für den Abbau der LDH bei Bestrahlung unter Distickstoffoxid über denen unter Stickstoff, was für die höhere Wirksamkeit der OH - Radikale spricht.

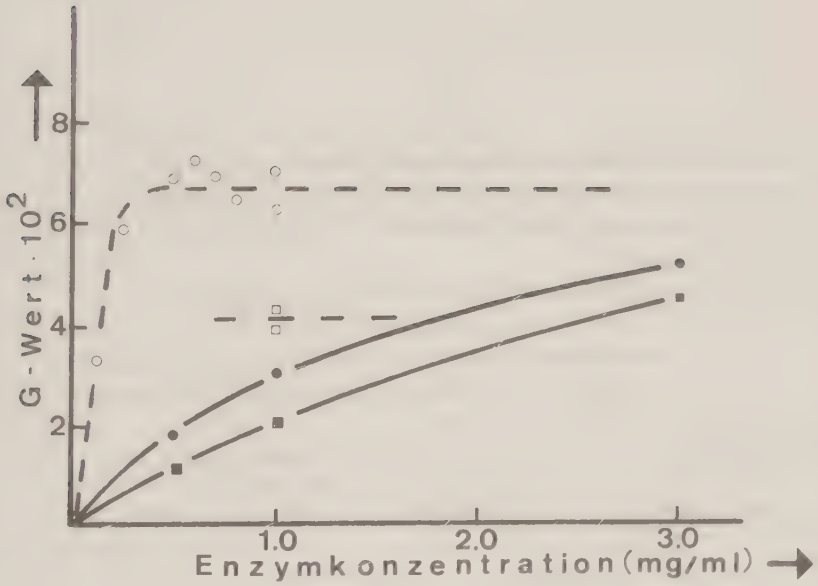


Abb. 16 Gegenüberstellung der G - Werte für
 ○ LDH Inaktivierung unter N₂
 □ LDH Inaktivierung unter Luft
 ● LDH Abbau unter N₂
 ■ LDH Abbau unter Luft

4

DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit sollten mit Hilfe der SDS - PAGE Veränderungen an der Struktur der LDH nach Radiolyse unter Stickstoff und Distickstoffoxid gezeigt werden. Die Versuchsergebnisse zeigen, daß sowohl bei Bestrahlung unter Stickstoff wie auch unter Distickstoffoxid eine lineare Abnahme der Farbausbeute für die LDH - Unter-einheit mit der Dosis erfolgt.

Die G - Werte für diesen Abbau nehmen mit der Anfangs-konzentration von LDH zu und waren bei der Radiolyse unter Distickstoffoxid höher als unter Stickstoff.

Als Bestrahlungsprodukt konnte vor allem aggregierte LDH nachgewiesen werden und nur in geringem Maße Proteinfragmente.

Mit Hilfe der SDS - Gelelektrophorese trennt man Proteine nach ihrem Molekulargewicht. Bei der Radiolyse erhält man unterschiedlich große Bestrahlungsprodukte, da es zur Aggregation und zum Peptidkettenbruch kommen kann.

Nach Garrison (52) gibt es für die Primärradikale des Wassers folgende Möglichkeiten mit dem Enzym zu reagieren :

1)



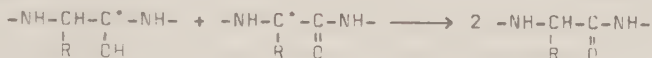
2)



Bei der Radiolyse unter Stickstoff erhält man sowohl das reduzierte Peptidradikal nach Gleichung 1, wie das oxidierte C_{α} - Radikal nach Gleichung 2.

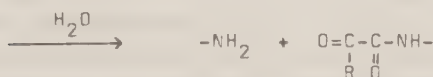
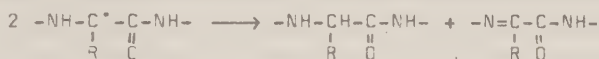
Eine Reaktion dieser beiden Radikale kann zu einer Rückbildung der Peptidbindung, eventuell unter Racemisierung, führen.

3)



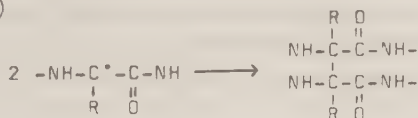
Bei der Radiolyse unter Distickstoffoxid entstehen nur C_{α} - Radikale. Nach Garrison soll es bei diesen Radikalen unter Stickstoff zu einer Disproportionierungsreaktion 4) kommen, die zum Bruch der Peptidkette führt.

4)

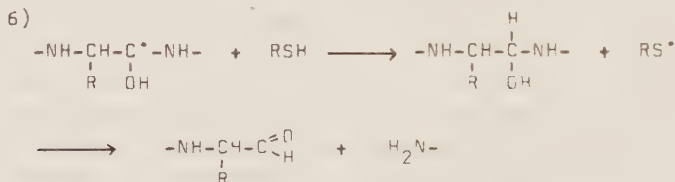


Nach Untersuchungen von Liebster und Kopoldova (53) kommt dieser Reaktion keine große Bedeutung zu, da sie bei der Radiolyse von Peptiden unter Stickstoff kaum Peptidkettenbrüche nachweisen konnten, hingegen aber sehr viele Dimere der Peptide. Daher nehmen sie an, daß bei Ausschluß von Sauerstoff vor allem Peptidradikale miteinander unter Ausbildung einer neuen kovalenten Bindung reagieren.

5)



Bei großen Molekülen kann diese Reaktion auch intramolekular erfolgen. Da LDH sehr viele SH - Gruppen enthält, ist eine andere Reaktion, die ebenfalls von Garrison angegeben wird, auch möglich. Danach kann das reduzierte Peptidradikal durch SH - Gruppen weiter reduziert werden, so daß es zum Bruch der Peptidkette kommt.



Nach diesen Mechanismen kann es also bei Radiolyse von LDH unter Stickstoff durch Disproportionierung oder Reduktion durch SH - Gruppen zum Peptidkettenbruch kommen.

Denkl (46) zeigte bereits, daß in Gegenwart von hohen Salzkonzentrationen bei der Radiolyse der LDH Proteinfragmente entstanden. Bei gleichen Radiolysebedingungen, die in der hier vorgelegten Arbeit benutzt wurden, fand Niemczyk (22), daß die Aggregate, die beim Bestrahlen mit 4000 Gray von LDH in einer Konzentration von 3,4 mg/ml entstanden waren, bei Einwirkung von SDS in Proteinfragmente mit Molekulargewichten von 15 000, 8 500 und 500 zerfielen.

Peuten (23) untersuchte LDH, die in einer Konzentration von 1 mg/ml unter Stickstoff mit einer Dosis von 2000 Gray bestrahlt worden war. Nach Einwirkung von SDS ließen sich aus diesem Bestrahlungsprodukt durch Gelfiltration keine Proteinfragmente abtrennen. Nach Bestrahlung von LDH bei einer Konzentration von 1 mg/ml

unter Distickstoffoxid mit einer Dosis von 1000 Gray konnte von Proksch (54) nach Einwirkung von SDS ebenfalls kein Bruch der Peptidkette nachgewiesen werden. Nach Reduktion ließen sich in sehr geringen Mengen Proteinfragmente nachweisen.

Bei der LDH besteht die Möglichkeit, daß Peptidkettenbrüche im Molekül durch die Reaktion 6 entstehen, bei der Moleküle mit SH - Gruppen mit Proteinradikalen reagieren. Diese Reaktion wird sicher langsamer verlaufen als eine Radikal - Radikalreaktion und ihre Geschwindigkeit wird abhängig sein von der Konzentration an SH - Gruppen bzw. von der LDH Konzentration. Daher war erwartet worden, daß bei hoher LDH Konzentration, ähnlich wie in der Arbeit von Niemczyk, sich ein größerer Teil des Proteins nach der Radiolyse als Fragmente nachweisen ließen. Bei der elektrophoretischen Auftrennung ließen sich aber unter Einwirkung von SDS bei allen untersuchten Konzentrationen nur in sehr geringen Mengen Proteinfragmente finden.

Diesen Widerspruch könnte man, ohne einen schlüssigen Beweis liefern zu können, durch die unterschiedlichen Bedingungen der beiden Arbeiten zu erklären versuchen. Niemczyk bestrahlte 3,4 mg LDH / ml mit 4000 Gray, unterzog die bestrahlte Probe einer Gelfiltration und untersuchte dann nur das im Ausschlußvolumen eluierte Protein, entsprechend einem MG von ca. 800 000. Um diesem Protein SDS in ausreichender Menge zusetzen zu können, mußte ein Pufferwechsel und anschließend eine Diafiltration durchgeführt werden, bei der ein großer Teil des Proteins verloren ging (Niemczyk S.29). Die von Niemczyk gefundenen Stücke entsprechen insgesamt etwa 10% der Anfangsmenge.

In dieser Größenordnung dürften sich auch die von uns gefundenen Proteinbruchstücke bewegen.

Nach der Lösung in SDS - Phosphatpuffer fand Niemczyk bei erneuter Gelfiltration nur noch Bruchstücke vom MG 15 000, 8 500 und 500. Die Elektrophorese bietet bei dem verwendeten System nicht die Möglichkeit Proteine mit einem MG unter 14 000 nachzuweisen, so daß der größere Teil der von Niemczyk gefundenen Stücke dem Nachweis bei der Elektrophorese entgeht.

Auf Grund der Ergebnisse der hier vorgelegten Arbeit muß man annehmen, daß es unter Stickstoff und Distickstoffoxid bei der Radiolyse vor allem zur Bildung von neuen kovalenten Bindungen kommt, wie es von Liebstner und Kapoldova bei Peptiden gezeigt wurde.

Ein großer Teil der Veränderungen der LDH bei Bestrahlung der sauerstofffreien Enzymlösung muß wohl der Bildung von intermolekularen kovalenten Bindungen zugeschrieben werden.

Wir finden bei der Elektrophorese einen Peak, der dem Molekulargewicht von dimerer LDH entspricht, sowie eine Ansammlung von Produkten kurz nach der Auftragstelle, die als Trimer und Tetramer bezeichnet werden können. Die Menge dieser Aggregate konnte wegen des schon erwähnten erhöhten Untergrundes nicht bestimmt werden. Im übrigen ist nicht geklärt, ob das Färbeverhalten der Aggregate mit dem der nativen LDH übereinstimmt, da auch bei verschiedenen Proteinen die Anfärbbarkeit stark variiert und bei der Bestrahlung viele reaktive Gruppen des Enzyms verändert werden.

Bei der Gelfiltration sind die Aggregate in den Fraktionen zu finden, die ein höheres Molekulargewicht als das Tetramere der LDH - Untereinheit ergeben (24).

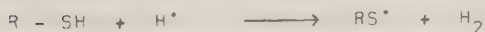
Diese hochaggregierten Moleküle können aber in das von uns verwendete 10% - Gel nicht eindringen, da das nur Molekülen bis zu einem Molekulargewicht von 70 000 möglich ist, und entziehen sich deshalb dem Nachweis. Um auch diese Aggregate auftrennen zu können wäre es nötig gewesen Acrylamidgele mit Gelgradienten zu verwenden.

Diese Methode schien uns aber für die Einführung der Gel - Elektrophorese zu schwierig, da deren Reproduzierbarkeit von einer Reihe von Parametern mehr abhängig ist als die der Elektrophorese mit homogenen Gelen. Bei der SDS - Gelelektrophorese sind nur Aggregate, die über kovalente Bindungen verknüpft sind, beständig. Durch Einwirkung von $\text{OH}^\bullet$ - Radikalen auf Proteine entstehen einmal, wie von Garrison gezeigt wurde, C_α - Radikale.

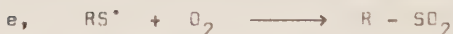
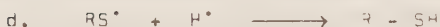
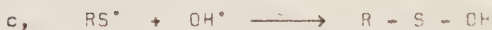
Außerdem entstehen bevorzugt an den aromatischen Seitenketten Radikalstellen. Wenn diese Radikale miteinander reagieren, kommt es zur Ausbildung von kovalenten und chemisch sehr stabilen Bindungen wie $-\text{C}-\text{C}-$ oder $-\text{C}-\text{O}-$.

Die LDH enthält auch 16 SH - Gruppen, die mit allen Primärradikalen sehr schnell reagieren.

Die SH - Gruppen werden auch als Radikalfänger bezeichnet. Sie reagieren folgendermaßen mit Radikalen (55) :



Die entstandenen RS - Radikale können so weiterreagieren :



Einen Beitrag zur Aggregatbildung können dabei nur die Reaktionen a, und b, leisten.

Dabei läßt sich mit unserer Arbeitsmethode die Bildung von Disulfidbrücken dadurch nachweisen, daß sie mit Mercaptoäthanol gespalten werden und dann mit einer nicht reduzierten Probe in Beziehung gesetzt werden. Wir fanden dabei, daß etwa 10% der Aggregate durch solche S - S Brücken entstanden sind.

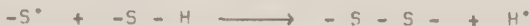
Daß trotz der relativ großen Zahl von SH - Gruppen nicht mehr solche Bindungen entstehen, mag daran liegen, daß nicht viele Sulfhydrylgruppen an der Oberfläche des Moleküls liegen und so die Reaktion zweier SH - Radikale an verschiedenen Untereinheiten durch die sterische Anordnung behindert wird (48).

Auch bei der Aminosäurenanalyse von bestrahlter LDH konnten keine meßbaren Mengen Cystin gefunden werden (46), was einem Fehlen von Disulfidbrücken entspricht.

Beim Nachweis der freien SH - Gruppen ließ sich zeigen, daß nach Bestrahlung der LDH mit einer Dosis von 4000 Gray der SH Gehalt zwar um 20% abgenommen hatte, eine Oxidation dieses Cysteins konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (56,57).

Die von uns gefundene Zunahme der Disulfidbrückenbildung mit der Konzentration des Proteins bei Bestrahlung kann damit erklärt werden, daß die Möglichkeit gesteigert wird, daß es zu folgender Molekül - Radikalreaktion kommt :

7)



Diese Reaktionsmöglichkeit kann auch eine Erklärung dafür sein, daß bei LDH im Gegensatz zur Ribonuklease die Ausbeute an strahleninduziertem Aggregat mit der Proteinkonzentration ansteigt.

Vergleicht man nun die Aggregatbildung unter Stickstoff und unter Distickstoffoxid, so kann man feststellen, daß die Menge an Aggregaten und Bruchstücken unter den verschiedenen Bestrahlungsbedingungen nicht wesentlich verschieden ist. Da wegen der geringen Menge der Aggregate und Bruchstücke keine Messung derselben möglich war, kann über prozentuale Unterschiede der Produkte unter Stickstoff und Distickstoffoxid keine Aussage gemacht werden. Da wir den schnelleren Abbau der LDH unter Distickstoffoxid einer Aggregatbildung zuschreiben, dürfen wir wohl unter diesen Bestrahlungsbedingungen eine höhere Aggregatausbeute annehmen.

Es entstehen unter N_2 und N_2O etwa 10% S - S Bindungen, wobei mit ansteigender Konzentration der Anteil der S - S Bindungen unter N_2O etwas schneller ansteigt als unter N_2 .

Neben der Bildung intermolekularer Bindungen muß man nach der Radiolyse großer Proteinmoleküle auch mit der Bildung intramolekularer kovalenter Bindungen rechnen. Wahrscheinlich wird mit abnehmender Proteinkonzentration die Anzahl intramolekularer Bindungen auf Kosten intermolekularer zunehmen, da bei niedrigen Proteinkonzentrationen es kaum zu den vorher beschriebenen Molekül - Radikalreaktionen kommt. Außerdem wird es bei gleicher Primärradikalkonzentration und niedriger Proteinkonzentration relativ häufig zu mehreren Radikalstellen an einem Proteinmolekül kommen, die dann unter Radikal - Radikalreaktionen im Molekül rekombinieren. So eine Reaktion führt zwar zu einer Veränderung des Proteinmoleküls, aber nicht notwendigerweise zum Verlust der Farbausbeute bei der LDH Bande. Entsprechend ist der gemessene G - Wert für den Abbau der LDH Untereinheit bei niedrigen Proteinkonzentrationen auch niedriger als bei hohen Proteinkonzentrationen.

Peuten (23) hatte bereits bei seinen Untersuchungen feststellen können, daß LDH, die in einer Konzentration von 1 mg/ml unter Stickstoff mit 2000 Gray bestrahlt worden war, intramolekulare Quervernetzungen enthält, insbesondere auch intramolekulare S - S Gruppen.

Nach der Radiolyse ließen sich die LDH Moleküle sehr viel schwerer mit SDS entfalten und zeigten bei Gelfiltration ein kleineres Molekülvolumen.

Bei Quervernetzungen in den Molekülen wird weniger SDS an das Protein gebunden und dadurch die elektrophoretische Mobilität vermindert (44).

Bei unseren elektrophoretischen Auftrennungen der bestrahlten Proben zeigte sich immer eine erhöhte Untergrundfärbung von der Auftragstelle bis zum Peak

der nativen LDH, die mit der Dosis ansteigt. Möglicherweise ist diese Färbung verursacht von verschiedenen intramolekular quervernetzten Proteinmolekülen. Ein Teil dieser Grundlinienanhebung könnte dem Umstand anzulasten sein, daß die Färbung mit CBB bei eng aneinanderliegenden Proteinbanden einen erhöhten Farbstoff Untergrund zwischen diesen Banden ergibt (58). Da CBB an den Protein - SDS Komplex durch elektrostatische und Van der Waals Kräfte gebunden wird, ist es auf der anderen Seite so, daß bei intramolekularen Bindungen, die die Anlagerung von SDS behindern, auch die Anfärbung mit CBB geringer ist.

Es kann leider bisher noch nicht bestimmt werden in welchem Umfang diese beiden gegenläufigen Mechanismen wirksam werden, so daß hier lediglich die Tatsache dieser intramolekularen Bindungen berichtet werden kann, ohne über das Ausmaß derselben eine Aussage machen zu können. Für das Bestehen solcher intramolekularer Bindungen spricht auch, daß sich auch bei Messung im UV - Licht, bei der nur die reine Enzymabsorption gemessen wird, zwischen Anfangspeak und Peak in Position der nativen LDH eine erhöhte Grundlinie darstellt. Diese Messungen wurden nur vergleichsweise durchgeführt und werden in einer gesonderten Arbeit behandelt werden. Buchanan (8) führt Inaktivierung von LDH allein auf Modifizierung zurück und berücksichtigt keine Strukturveränderungen.

Offinger (59) zeigt, daß unter verschiedenen Bestrahlungsbedingungen kein Zusammenhang zwischen Abbau von Aminosäuren und Inaktivierung besteht und nimmt auch an, daß andere Molekülveränderungen die Inaktivierung hervorrufen.

Er zeigt zum Beispiel, daß bei Erhöhung der $\text{OH}^\bullet$ - Radikalkonzentration bei Bestrahlung unter Distickstoffoxid der Abbau der Aminosäuren nicht verstärkt ist, obwohl die Inaktivierung zunimmt. Allerdings ist gleichzeitig die Aggregation stärker.

Metzger (21) zeigt, daß auch zwischen Tryptophan - Abbau und Inaktivierung kein Zusammenhang besteht. Auf Grund unserer Ergebnisse nehmen wir an, daß bei niedriger Proteinkonzentration die Modifikation ohne starke Vergrößerung der Enzymmoleküle die Inaktivierung bewirkt, während bei höherer Proteinkonzentration unter Stickstoff und Distickstoffoxid die Aggregation zur Inaktivierung führt.

Die Entnahme von Proben während der Bestrahlung zeigte, daß sich die Molekülveränderungen der monomeren Einheit der LDH linear zur Bestrahlungsdosis verhalten, während der Aktivitätsverlust einen logarithmischen Verlauf darstellt (21,22,23,46).

Diese Abweichung zwischen Inaktivierung und LDH Verlust kommt dadurch zustande, daß bei der Bestrahlung entstehende Radikale zuerst mit speziellen, an der Oberfläche des Moleküls liegenden Gruppen reagieren (5,9,10,11), die zwar keine Änderung der Primärstruktur, wohl aber der Stellung der Gruppen zueinander, also der Konformation, bedingen, die für die enzymatische Aktivität von entscheidender Bedeutung ist.

Die Untereinheiten der LDH werden nicht einzeln inaktiviert, sondern mit der Veränderung einer monomeren Einheit wird das gesamte Enzym inaktiv (60,61,62). Darauf deuten auch Untersuchungen von Buchanan hin (8), der fand, daß die Verminderung der Aktivität geringer ausfällt, wenn vor der Bestrahlung Substrat und Cosubstrat an das Enzym

gebunden wurde und damit eine Änderung der Stellung des aktiven Zentrums behindert wurde.

Bei unserer Fragestellung konnten diese Konformationsänderungen nicht beurteilt werden, da sie durch die SDS Geladung des Enzyms alle außer Kraft gesetzt und die LDH in ihre Untereinheiten zerlegt wurde.

Es wurde hier also nur untersucht, welche Auswirkungen die OH - Radikale, H - Radikale und solvatisierten Elektronen auf die Untereinheit der LDH haben.

Die Zerstörung einzelner Aminosäuren durch Hydroxilierung und Desaminierung, die bei der Bestrahlung von Peptiden nachgewiesen wurde (53) und auch bei der Bestrahlung von LDH für einige Aminosäuren gefunden wurde (59), kann mit der Elektrophorese nicht bestimmt werden, da sie nicht für die Änderung der Struktur, wohl aber für die Minderung der Aktivität eine Rolle spielt.

Da die Konformation der LDH nicht, wie zum Beispiel bei Ribonuclease, durch S - S Bindungen stabilisiert wird, sondern lediglich durch H - Brücken, hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen, die eine geringe Bindungsenergie aufweisen, ist leicht einzusehen, daß diese Bindungen durch die Reaktion weniger Aminosäuren mit den energiereichen Radikalen aufgehoben werden können. Die von Schüssler (63) beschriebene gute Übereinstimmung von Aktivitätsverlust und Abbau des nativen Peaks bei Elektrophorese nach Bestrahlung unter anaeroben Bedingungen kann aus unseren Ergebnissen für hohe Enzymkonzentrationen bestätigt werden (siehe Tab. 4). So konnten bei einer LDH Konzentration von 3 mg/ml bei einer Dosis von 2000 Gray unter Stickstoff noch 90% des nativen Peaks als aktiv bezeichnet werden.

Bei abnehmender Konzentration eilt aber die Inaktivierung dem Enzymabbau immer weiter voran. Bei einer Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml und einer Dosis von 1000 Gray bei Bestrahlung unter Distickstoffoxid beträgt der aktive Anteil des nativen Peaks nur noch 9% vom Ausgangswert.

Da bei der Bestrahlung von wässrigen Lösungen pro 100 Elektronenvolt 5,9 Primärradikale entstehen, läßt sich mit Hilfe der G - Werte aus der Tabelle 5 (s.S. 54) errechnen, wie viele Radikale auf die Inaktivierung und wie viele auf den Abbau eines LDH Moleküls treffen.

Tabelle 6

a, $\frac{\text{Radikale}}{\text{LDH}_{\text{inakt.}}}$	b, $\frac{\text{Radikale}}{\text{LDH}_{\text{Abbau}}}$	Differenz b - a	cLDH mg/ml	Gas
123	125	2	3,0	N ₂
168	281	113	1,0	N ₂
97	211	114	1,0	N ₂ O
97	347	250	0,5	N ₂ O

Aus dieser Tabelle wird deutlich, daß, wenn die bei hoher Konzentration zur Inaktivierung notwendigen Reaktionen stattgefunden haben, dies dann auch ausgereicht hat, um das Molekül zu aggregieren.

Bei niederen Konzentrationen dagegen bedarf es einer Zahl von Radikalen, die ein mehrfaches der zur Inaktivierung nötigen Radikale beträgt, um zu einer Aggregation zu führen.

Das ist einerseits darauf zurückzuführen, daß bei geringer Konzentration weniger Protein - Protein - reaktionen stattfinden können und zum anderen, daß die Wasserradikale häufiger Rekombinations - Reaktionen eingehen können, da sie seltener auf reaktionsfähiges Enzym treffen. Die aus Tabelle 6 zu ersehende Tatsache, daß unter Distickstoffoxid bei gleicher Protein-konzentration weniger Radikale sowohl zur Inaktivierung als auch zum Abbau des Enzyms nötig sind als unter Stickstoff, belegt die Aussage der größeren Wirksamkeit der OH - Radikale.

LDH wurde in einer wässrigen Phosphatpufferlösung einer Röntgenbestrahlung unter Stickstoff und Distickstoffdioxid ausgesetzt. Die nach verschiedenen Zeiten entnommenen Proben wurden auf eine Konzentration von 0,5 mg Protein pro ml Lösung verdünnt und nach Zugabe von SDS für 5 Minuten auf 100°C erhitzt.

Bei einem Teil der Proben wurden eventuell vorhandene Disulfidbrücken durch Zugabe von Mercaptoäthanol gespalten.

Die so vorbehandelten Proben wurden mit Hilfe einer SDS - Phosphatgel Elektrophorese aufgetrennt.

Nach Färbung und photometrischer Densitometrie der Gele wurde die Farbausbeute der Proteinbanden durch Planimetrie bestimmt.

Es konnte gezeigt werden, daß die entstehenden Aggregate bis zur Größe des Tetrameren zum größten Teil durch kovalente Bindungen verknüpft sind, sowie, daß Bruchstücke nur in verschwindend kleiner Menge entstehen. Über die nach längerer Bestrahlung entstehenden Produkte konnte keine exakte Aussage gemacht werden. Es dürfte sich aber nach unserer Meinung um Moleküle handeln, die durch intramolekulare Bindungen in der Gelwanderung behindert sind und deshalb nicht als einheitliche Front wandern, sondern je nach sterischer Hinderung den Raum von der Auftragstelle bis zum nativen Peak mehr oder weniger kontinuierlich belegen.

Auch die Messungen im UV - Licht zeigten eine angehobene Grundfläche von der Auftragstelle bis zur Bande in Höhe der nativen LDH, was für die Minderung der Wanderstrecke durch intramolekulare Bindungen spricht.

Beim Verfahren mit Anfärbung läßt sich darüber keine sichere Aussage machen, da CBB die Eigenschaft hat, bei nahe beieinander liegenden Proteinbanden zwischen diesen eine erhöhte Grundfärbung zu verursachen.

Es ließ sich zeigen, daß OH - Radikale eine stärkere Veränderung bewirken als H - Radikale und solvatisierte Elektronen, da bei Bestrahlung unter Distickstoffoxid der Peak der nativen LDH am schnellsten abnahm.

Für die Strahlenwirkung konnte gezeigt werden, daß zum Abbau der LDH Moleküle eine höhere Strahlendosis notwendig ist als zur Inaktivierung. Mit steigender Konzentration nähern sich die beiden Werte immer mehr. Dies zeigt, daß bei niedrigen Konzentrationen die Konformationsänderung, bei hohen dagegen die Aggregation hauptsächlich zur Inaktivierung des Enzyms führt. Disulfidbrücken wurden als Beitrag zur Aggregatbildung in 5 - 15% der entstandenen Aggregate nachgewiesen, wobei eine Steigerung linear zur Konzentration zu bemerken war.

Unter den gewählten Bestrahlungsbedingungen spielen nach unserer Meinung Brüche im LDH Molekül keine Rolle.

Wir schreiben die Veränderungen der Untereinheit der LDH unter Bestrahlung zum größten Teil einer Aggregatbildung durch kovalente Bindungen zu und zu einem geringeren, nicht genau zu eruiierenden Teil, der Bildung von kovalenten intramolekularen Bindungen.

1. Taylor, S.S.
Allison, W.S.
Kaplan, N.O. : J.Biol.Chem. 250,8740 (1975)
2. Adams, M.J. et al.: Nature 227,1098 (1970)
3. Kiltz, H.H. et al.: Hoppe Seiler's Z.
physiol.Chem. 358,123 (1977)
4. Eventoff, W.e.a. : Proc.nat.Acad.Sci. 74,2677 (1977)
5. Fondy, T.F. e.a. : J.Biol.Chem. 240,4219 (1965)
6. Holbrook, J.J. e.a: Eur.J.Biochem. 1,476 (1967)
7. Mella, K.
Fölsche, E.
Torff, H.J. Hoppe Seiler's Z.
Pfleiderer, G. : physiol.Chem. 349,891 (1968)
8. Buchanan, J.D.
Armstrong, D.A. : Int.J.Radiat.Biol. 30,115 (1976)
9. Gold, A.H.
Segal, H.L. : Biochemistry 4,1506 - 1511 (1965)
10. Holbrook, J.J. : Biochem.Z. 344,141 - 152 (1966)
11. Holbrook, J.J.
Stinson, R.A. : Biochem.J. 120,289 - 297 (1970)
12. Holbrook, J.J.
Liljas, A.
Steindel, S.J. The Enzymes Chap.X edited
Rossmann, M.G. : by P.D.Boyer p.191 (1975)
13. Halwer, M. : J.Am.Chem.Soc. 73,4870 (1951)
14. Harburg, H.A.
Foley, K.A. : Proc.Natl.Acad.Sci. 44,662 (1958)
15. Braams, R. : Rad.Res. 27,319 (1966)
16. Henglein, A.
Schnabel, W. Einführung in die
Wendenburg, J. : Strahlenchemie S. 131 (1969)

17. Weiss, J. : Nature(London) 157,584 (1946)
18. Weiss, J. : Nature(london) 186,751 (1960)
19. Hart, R. L.
Boag, J. W. : J. Amer. Chem. Soc. 84,4090 (1962)
20. Keene, J. P. : Nature(London) 197,47 (1963)
21. Metzger, W. : Dissertation Erlangen (1976)
22. Niemczyk, P. : Dissertation Erlangen (1974)
23. Peuten, P. M. : Dissertation Erlangen (1976)
24. Zahn, H. T. : Dissertation Erlangen (1976)
25. Di Sabato, G.
Pesce, A.
Kaplan, N. C. : Biochem. Biophys. Acta 77,135 (1963)
26. Eichhorn, M. : Dissertation Erlangen (1973)
27. Nelson, C. A. : J. Biol. Chem. 246,3895 (1971)
28. Di Sabato, G.
Kaplan, N. D. : J. Biol. Chem. 239,438 (1964)
29. Reynolds, J. A.
Tanford, C. : J. Biol. Chem. 245,5161 (1970)
30. Pitt-Rivers, R.
Inpiombato, F. S. A. : Biochem. J. 109,825 (1968)
31. Reynolds, J. A.
Tanford, C. : Proceedings of the National
Academy of Sciences 66,1002 (1970)
32. Neuhoﬀ e. a. : Phys. Chem. 354,1359 (1973)
33. Shapiro, A. L.
Vinuela, E.
Maizel, J. V. : Biochem. Biophys.
Res. Commun. 28,815 (1967)
34. Weber, K.
Osborn, M. : J. Biol. Chem. 244,4406 (1969)

35. Fricke, H. : J.Chem.Physic. 3,60 (1935)
36. Frankenberg, D. : Physics in Medicine and
Biology 14,597 (1969)
37. Weber, K.
Osborn, M. : The Proteins Volume I S.180
Herausgeber Neurath, H. Hill, R.L.
Acad.press New York London
San Franzisco (1975)
38. Leslie, C.Lane : Analyt.Biochem. 86,656 (1978)
39. Dunker, A.K.
Rueckert, R.R. : J.Biol.Chem. 244,5074 (1969)
40. Fish, W.U.
Reynolds, J.A.
Tanford, C. : J.Biol.Chem. 245,5166 (1970)
41. Ferguson, K.A. : Metab.Clin.Exp. 13,985 (1964)
42. Hedrick, J.L.
Smith, A.J. : Arch.Biochem.Biophys. 126,155 (1968)
43. Shapiro, A.L.
Maizel, J.V. : Anal.Biochem. 29,505 (1969)
44. Davies, G.E.
Stark, G.R. : Proc.Nat.Acad.Sci. 66,651 (1970)
45. Draganic, J.G. : The Radiation Chemistry of
water, Acad.press New York (1971)
46. Denkl, C.P. : Dissertation Erlangen (1971)
47. Kunigk, K. : Dissertation Erlangen (1973)
48. Buchanan, J.D.
Armstrong, D.A. : Int.J.Radiat.Biol. 32,247 (1977)
49. Sortner, S.
Ottolenghi, S.
Rabani, S.
Stein, G. : J.Chem.Phys. 37,2488 (1962)
50. Rao, P.S.
Hayon, E. : J.Phys.Chem. 79,109 (1975)

51. Froth, F. . .
De Webster, R.G.
Datyner, A. : Biochem.Biophys.Acta 71,377 (1963)
52. Garrison, W.M. : Rad.Res.Rev. 3,305 (1972)
53. Liebster, J.
Kopoldova, J. : Rad.Res. 27,162 - 173 (1966)
54. Proksch : Dissertation Erlangen (1979)
55. Hofmann, M.Z.
Hayon, E. : JACS 94,7950 (1972)
56. Winstead, J.A.
Reece, T.C. : Rad.Res. 41,125 - 134 (1970)
57. Müller, E. : Dissertation Erlangen (1973)
58. Maurer, H.R. : Disk Elektrophorese S.68 (1968)
59. Offinger, P.M. : Dissertation Erlangen (1976)
60. Jaenike, R. : Eur.J.Biochem. 63,149 - 155 (1974)
61. Rudolph, R.
Jaenike, R. : Eur.J.Biochem. 63,409 - 417 (1976)
62. Chan, W.W-C.
Mosbach, K. : Biochemistry 15,4215 - 4222 (1976)
63. Schüssler, H.
Herget, A. : Int.J.Radiat.Biol. 37,71 (1980)

Lebenslauf

Am 18. April 1950 wurde ich als 3. von 4 Kindern des Autoschlossers Hans Huth und seiner Ehefrau Anna, geb. Webert, in Nürnberg geboren.

Von 1956 bis 61 besuchte ich die Volksschule Uhlandschule in Nürnberg und wechselte nach der 5. Klasse an das Melanchthon - Gymnasium Über.

Im Juni 1971 beendete ich dort mit dem Erwerb des Reifezeugnisses meine Schulzeit.

Vom Juli 1971 bis zum Juni 1973 war ich als Soldat auf Zeit bei der Bundeswehr.

Im Oktober 1973 begann ich das Studium der Pädagogik an der Pädagogischen Hochschule der Universität Erlangen - Nürnberg.

Im Oktober 1974 wechselte ich zum Studium der Medizin nach Erlangen.

Am 16. Oktober 1980 beendete ich das Studium mit dem Bestehen der ärztlichen Prüfung.

Mit Wirkung vom 24. Oktober 1980 wurde mir vom Bayerischen Staatsministerium des Innern die Approbation als Arzt erteilt.

